# EXPERIENTIA

EST EXPERIENTIA SCIENTIA PARACELSUS

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY APR 23 55

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

F. A. Kipp: Die Entstehung der menschlichen Lautbildungsfähigkeit als Evolutionsproblem . . . . . 89

*Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports*

I. Kandel und M. Kandel: Über die Bindungsart der Glutamylreste im $p$-Aminobenzoylpolypeptid aus Hefe . . 95
J. Kováks, I. Kandel, M. Kandel und V. Bruckner: Über die Bindungsart der amidierten Reste der $\beta$-Aminodicarbonsäuren in Eiweißstoffen . . . . . 96
N. P. Buu-Hoï, N. D. Xuong, N. H. Nam, J. M. Gazave, J. Pillot et L. Schembri: Activité tuberculostatique de nouvelles N,N′-diarylthiourées . . . . . 97
A. Cerletti, H. Konzett und M. Taeschler: Canescin, ein mit Reserpin wirkungsgleiches Alkaloid aus *Rauwolfia canescens* . . . . . 98
A. S. Meyer: 19-Hydroxylation of $\Delta^4$-Androstene-3,17-dione and Dehydroepiandrosterone by Bovine Adrenals 99
G. Benassi: Sul comportamento della sostanza fondamentale in membrane connettivali di ratto albino durante il passaggio di una soluzione salina . . . . . 102
M. E. Scarascia Venezian: Acridine Orange Action on the Biochemical Metabolism of the Leaf Tissues of the Tobacco Plant . . . . . 104
Maria Bassi and A. Bernelli-Zazzera: Preliminary Studies on the Metabolism of Vacuolated Cells Following Hypoxia . . . . . 105
A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin: Über Pflanzenwachstumsregulatoren . . . . . 107
H. v. Euler: Einfluss von Streptomycin und von Tetracyclinen auf die Entwicklung keimender Samen . . . . . 108
Isao Motomura: On the Irreversible Agglutination of the Sperm of the Sea-Urchins Caused by the Sperm Extract 110
A. Cresseri: Observations on Vitamin $B_{12}$ Binding Factor from Hog Gastric Mucosa . . . . . 111
J. L. Sirlin: Nuclear Uptake of Methionine-$S^{35}$ in the Newt Embryo . . . . . 112
P. N. Witt: Eine Spinne mit dem Körperbau von *Zilla-x-notata*, aber mit anderem Netzbauverhalten . . . . . 113
Ch. Rai and Sukh Dev: Cyclopentenones from Lactones . . . . . 114
W. Bolliger und G. G. Poretti: Ein neuer Probenwechsler für automatische Radioaktivitätsmessungen (Pro Laboratorio) . . . . . 115
B. Andersson and S. Larsson: A New Method for Intracerebral Injections (Pro Experimentis) . . . . . 116

*Informations - Informationen - Informazioni - Notes*

Studiorum progressus: I. Grundland: Essais d'élaboration des voies d'approche à la chimiothérapie du cancer. Action sur l'eau d'hydratation des tissus néoplasiques; action sur les protéines . . . . . 118
Studiorum progressus: H. Maske: Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas . . . . . 122
Congressus . . . . . 128

mit der Zeit gehen
heisst die Devise des fortschrittlichen Chemikers. Er bevorzugt deshalb die nach den modernsten Grundsätzen konstruierte METTLER Analysenwaage. Das Prinzip der konstanten Belastung gewährleistet maximale Genauigkeit. Verlangen Sie bitte eine unverbindliche Demonstration.
Mettler
ANALYSENWAAGE
E. METTLER ZÜRICH 1 SCHWEIZ PELIKANSTR. 19
TEL. (051) 25 25 70


*Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XI/3*

Benno Schwabe Verlag, Basel
Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
Birkhäuser Verlag, Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Geigy AG., Basel
International Union of Biological Sciences, Paris
E. Mettler, Zürich
Salvis AG., Luzern-Emmenbrücke
Sandoz AG., Basel
Sauter AG., Basel
Wild, Heerbrugg

---

*Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:*
*Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de postes des pays suivants:*

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Italien | Belgien, Luxemburg | Dänemark | Schweden | Portugal |
| Deutschland | Holland | Norwegen | Finnland | Marokko |

---


L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 36 francs pour la Suisse; pour l'étranger 46 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 36.–, im Ausland sFr. 46.–.

Insertionspreise: 1/1 Seite Fr. 220.–, 1/2 Seite Fr. 132.–, 1/4 Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 36.– per la Svizzera; all'estero fr. 46.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 36.–; other countries fr. 46.–. Prices in Swiss currency.

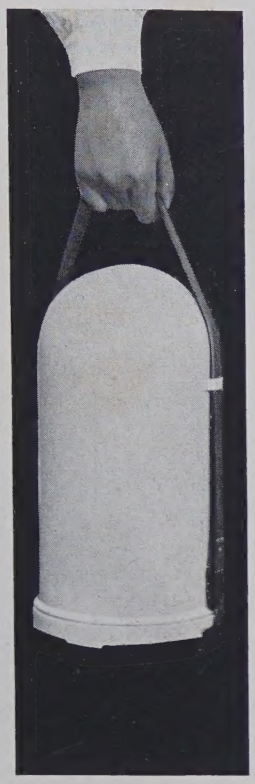
Prices for advertising: 1/1 page fr. 220.–, 1/2 page fr. 132.–, 1/4 page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.



*Copyright 1955 by Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telephon (061) 24 98 00; Telegrammadresse: Edita Basel*



*Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel*



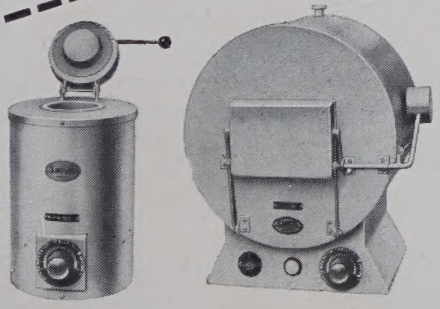
# M11

## Das neuartige, leicht tragbare Mikroskop

Leicht überall zum Mitnehmen im praktischen Metallbehälter. Ideal für **Reisen** und für jedes Labor usw. Läßt sich für Mikrophotographie, Phasenkontrast usw. ausbauen. Ist mit der ausgezeichneten Optik der Forschungsmikroskope ausgerüstet. Mit monokularem oder binokularem Tubus lieferbar. Schweizer Präzisionsarbeit. Ausführliche Beschreibung im Prospekt M 602.

**WILD**
HEERBRUGG

**Elektrische Wärmegeräte**
für Laboratorien

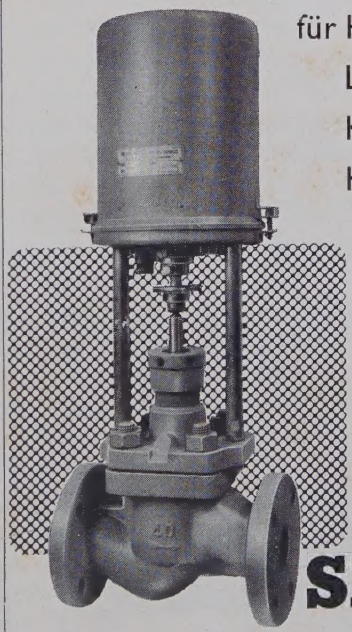


Elektrische Tiegel- und Muffelöfen

**Salvis**
SALVIS AG. Luzern-Emmenbrücke
Fabrik elektrischer Apparate

*Automatische*
*Schalt- und Regelapparate*

für Heizung
Lüftung
Klimaanlagen
Kühlung



**SAUTER**

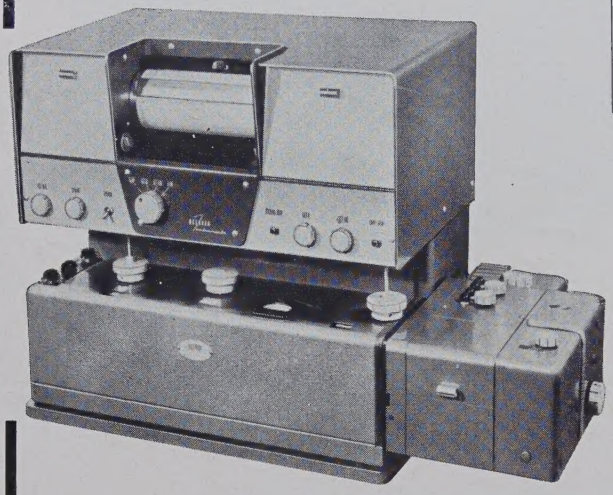
Fr. Sauter AG., Fabrik elektr. Apparate, Basel

# Neu!

**BECKMAN-**

MODELL DR

Automatik-Zusatz zum
**Quarz-Spektralphotometer**
Modell **DU**



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1 – 3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 mμ bis 1000 mμ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

Auskünfte, Beratung und Angebote durch

**GANZ & Co**
BAHNHOFSTR. 40
TEL(051) 23 97 73
*Zürich*



The International Union of Biological Sciences has still a limited number of copies available of:

## INDEX DES ZOOLOGISTES

comprising three lists: one of persons, a second by Countries and a third by specialities. Price 3,000 fr. fr.

## INDEX DES GÉNÉTICIENS

comprising two lists: one of persons, the other by Countries. Price 1,200 fr. fr.

Send orders to:

UNION INTERNATIONALE
DES SCIENCES BIOLOGIQUES
Publication Office (Prof. R. Ulrich)
1, rue Victor Cousin
PARIS (5e) (France)



## The Mammalian Fetus

*Physiological Aspects of Development*

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology

*Volume XIX (1954), 226 and xvi quarto pages, with numerous figures*

Authoritative reviews of research, evaluating present knowledge about the morphological, physiological, and biochemical factors affecting the development of the embryo, in particular the human embryo, presented in 26 papers and edited discussions.

Previous volumes still available: IX (1941) Genes and Chromosomes; XI (1946) Heredity and Variation in Microorganisms; XII (1947) Nucleic Acids and Nucleoproteins; XIII (1948) Biological Applications of Tracer Elements; XIV (1949) Amino Acids and Proteins; (1950) Origin and Evolution of Man; XVI (1951) Genes and Mutations; XVII (1952) The Neuron; XVIII (1953) Viruses.

Prices: Volumes IX–XV, $ 7; XVI–XIX, $ 8. Volumes IX, XV, XVI, and XVIII: any two, $ 14; any three, $ 20; all four, $ 26. Postage extra: domestic, 25 cents; foreign, 50 cents per volume.

BIOLOGICAL LABORATORY
COLD SPRING HARBOR, NEW YORK

EXPERIENTIA

Vol. XI - Fasc. 3 Pag. 89–128 15. III. 1955

# Die Entstehung der menschlichen Lautbildungsfähigkeit als Evolutionsproblem

Von F. A. Kipp[1], Marbach

Die Sprache gehört zu denjenigen Eigenschaften, welche den Menschen in besonders markanter Weise über die Tierwelt erheben. Die Entstehung der Sprachfähigkeit beruht vor allen Dingen auf der Entwicklung bestimmter Hirnzentren, namentlich des Brocaschen Zentrums, und in Zusammenhang damit der Entwicklung des begrifflichen Denkens. Zugleich ist die Sprache aber auch ein Problem der stimmlichen Entwicklung. Dass die Rätsel auf diesem letzteren Gebiet nicht gering anzuschlagen sind, ergibt sich aus der Tatsache, dass die Säugetiere, einschliesslich der Affen, nur über sehr dürftige Fähigkeiten der Lautvariation verfügen. Ohne Überbrückung treten beim Menschen ungeahnte Möglichkeiten der Stimmleistung hervor. Eine Vielzahl von Lauten, Vokalen und Konsonanten bilden das Verwirklichungsfeld für die menschliche Sprache. Der Abstand gegenüber den Stimmöglichkeiten der Anthropomorphen ist ganz aussergewöhnlich gross. Das Problem der Sprachentstehung wird also nicht nur durch die Erforschung der zerebralen Vorbedingungen zu klären sein, sondern betrifft auch die Stimmwerkzeuge, also Kehlkopf und Mundorgane.

Die folgenden Ausführungen befassen sich speziell mit dem Werden der *stimmlichen Voraussetzungen*. Dabei werden wir uns mit der Frage zu befassen haben, auf welcher Stufe der Primatenevolution diejenigen Umkonstruktionen des Kehlkopfes und der Mundorgane einsetzen, welche die Sprache ermöglichen. Beeinflusst durch die Tatsache, dass nur der Mensch spricht, hat man die auf die Sprache bezüglichen morphologischen Umbildungen gewöhnlich erst auf der Hominidenstufe gesucht. Wir werden sehen, dass wesentliche Vorbedingungen schon früher auftreten und dass zum Beispiel die Stimmarmut der Menschenaffen ihre besonderen Gründe hat. – Vorausgeschickt seien einige Bemerkungen über die auf dem Gebiet der Stimmentwicklung zu unterscheidenden Stufen. Damit berühren wir auch einiges von den psychologischen Grundlagen der Stimmäusserungen.

## *Stufen des Stimmgebrauchs*

Der Mensch eignet sich im frühen Kindesalter die Worte der Sprache durch Vorbild und Nachahmung an. Dazu bedarf er der Fähigkeit, gehörte Laute nachzuahmen, zu reproduzieren. Diese Fähigkeit besitzt der Mensch, indem er imstande ist, seine Stimme *willkürlich* zu betätigen und *willkürlich* zu modifizieren. Der freie, willkürliche Stimmgebrauch, der uns Menschen so selbstverständlich erscheint, ist in Wahrheit eine beinahe ebenso seltene Fähigkeit wie die Sprache selbst. Nur bei einigen Vogelgruppen findet man Anfänge eines freien Stimmgebrauches, hingegen nicht bei den Säugetieren.

Die Laute der Säugetiere sind Erregungsäusserungen; sie beziehen sich auf Schreck, Wut, Brunst und auf andere mit dem Sozialleben zusammenhängende Affekte. Die Bindung an die jeweiligen Affekte ist so streng, dass ohne deren Vorhandensein auch der entsprechende Laut nicht hervorgebracht werden kann. Das Stimmrepertoire, über das eine Art verfügt, wird vom einzelnen Individuum nicht erlernt, sondern ist angeboren. Im allgemeinen ist gerade bei den Säugetieren das Stimmrepertoire recht arm. Eine Reihe von Arten sind sogar annähernd stumm (zum Beispiel Hase, Giraffe). Die Fähigkeit zur Imitation artfremder Laute, die das Indizium für einen freien Stimmgebrauch wäre, fehlt den Säugetieren.

Auch bei den Stimmäusserungen der Vögel handelt es sich weitgehend um erblich festgelegte Affektlaute, zum Beispiel Lockrufe, Warnlaute, Balzrufe und dergleichen. Nur in zwei Gruppen, bei den Singvögeln und den Papageien, findet man darüber hinaus auch die Fähigkeit zur Nachahmung. Viele Singvögel vermögen artfremde Vogelstimmen täuschend genau zu imitieren, Raben und Papageien auch menschliche Worte mehr oder weniger gut nachzubilden. Diese Tatsache zeigt, dass *die Welt der Laute und Töne als solche* einen Reizwert für den Vogel gewinnt und spielerisch verwendet wird. Zweifellos hat man es hier mit einer fortgeschritteneren Stufe zu tun; die Stimme ist höheren Nervenzentren unterstellt als bei Arten, welche nur Affektlaute hervorbringen können. – Erwähnt sei, dass die imitierenden Singvögel die nachgeahmten Strophen gewöhnlich ihrem eigenen Gesang einflechten, was darauf hinweist, dass auch der Artgesang selbst einen höheren Rang einnimmt[1].

[1] Adresse: Erdmannhäuser Strasse 12, Marbach am Neckar.

[1] Vgl. auch O. Heinroth, J. Ornith. *72*, 223–244 (1924), und O. Köhler, J. Ornith. *93*, 3–20 (1951).

Der Mensch besitzt, wenn wir vom Schreien des Säuglings absehen, kaum irgendwelche vorgeformten, das heisst angeborenen Laute. Selbst die sogenannten Empfindungslaute (Interjektionen) sind weitgehend durch das Vorbild bestimmt und können auch ohne den Zwang von Affekten hervorgebracht werden. Schon früh beginnt das Kind, sein Stimmchen in vielseitigster Weise zu modifizieren. Dabei werden viel umfassendere Lautmöglichkeiten «erprobt», als sie später in der Muttersprache zur Anwendung gelangen. Der Anlage nach sind die differenten Lautgebilde verschiedenartigster Sprachen in diesem *Spielen mit der Stimme* vorhanden. Aus ihm entspringt dann bald auch die Fähigkeit zur Nachahmung von Wortbildungen. Erbliche Festlegung und Affektbindung sind beim Menschen fast vollständig zugunsten des freien Stimmgebrauches zurückgetreten.

Auf dem Gebiet der Stimmäusserungen sind somit drei verschiedene Stufen zu unterscheiden:

1. die affektgebundene Stimme,
2. der freie, willkürliche Stimmgebrauch,
3. die Sprache, in der die Stimme dem Begriffsausdruck dient.

Im Hinblick auf unser Thema bedürfen die Stimmleistungen bei den Affen noch besonderer Erwähnung. Ihren Affektäusserungen liegen einfachste Lautgebilde zugrunde, welche sich nur wenig über das Niveau der Stimmöglichkeiten anderer Säugetiere erheben. Doch sind die Affen im allgemeinen etwas stimmfreudiger als andere Säuger; auch unbedeutende Erregungen finden bereits stimmlichen Ausdruck. Ein neues Phänomen aber bilden die gesellig ausgeübten Brüllgesänge, die man namentlich von Brüllaffen und von Gibbons kennt. Bei den Brüllaffen, welche in geschlossenen Horden im Urwald umherziehen und sich gegen Nachbargruppen verteidigen, deutet man das Brüllen als Ausdruck der Sozietät und als Besitzdemonstration. Dies schliesst nicht aus, dass das Brüllen zugleich doch auch eine Art Spiel ist, und dass – im Unterschied zu reinen Affektlauten – die Stimmbetätigung als solche den Tieren Lust bereitet. Nicht allein die die Horde führenden Männchen, sondern auch die Weibchen und Jungtiere wirken bei den imposanten Brüllorgien mit. Trotz des zweifellos höheren Ranges dieser Lautäusserungen reichen dieselben nicht an den freien Stimmgebrauch heran, denn die Lautgebilde bewegen sich in sehr engen Normen.

Unter den höheren Affen besitzen die Gibbons die modulationsfähigste Stimme. Sie bringen Tonfolgen, welche zum Beispiel nach Art der Tonleiter ansteigen können; *Hylobates agilis* umfasst sogar eine ganze Oktave. Dagegen sind Orang-Utan und Gorilla ausgesprochen stimmarm (siehe unten), was kaum anders denn als ein Reduktionsphänomen gedeutet werden kann. Der etwas begabtere Schimpanse verfügt durch feine Abstufung und subtile Nuancierung seiner Laute zwar über einen verhältnismässig reichen Ausdrucksschatz. Aber die lautlichen Grundlagen bleiben äusserst dürftig (ziemlich monotone vokalische Laute wie «huu» oder «ho ho», Kreischen und Schreien) und stehen weit hinter denjenigen der Gibbons zurück.

Eine echte Imitation artfremder Laute kennt man von keinem Menschenaffen; die Brücke zur menschlichen Stimmfähigkeit fehlt ganz. Dies ist um so bemerkenswerter, als die Vögel einen freien Stimmgebrauch erreicht haben. Die Vögel gehören jedoch einer anderen phyletischen Linie an, auch dient bei ihnen nicht der Larynx, sondern der an der Gabelungsstelle der Luftröhre befindliche Syrinx als Stimmorgan. Die Stimme der Vögel ist daher nicht eine Vorstufe der menschlichen; auf ganz anderer Grundlage entfaltete sie sich aber bis zu einem gewissen Grad in analoger Richtung.

### *Der Kehlkopf*

Es ist hier nicht möglich, den Kehlapparat der Primaten in seinen komplizierten Einzelheiten zu besprechen, nur einige für das Stimmproblem besonders wichtige Punkte seien herausgegriffen.

Indem die menschlichen Sprachlaute erst unter der Mitwirkung der Mundorgane gebildet werden, spielt das Lageverhältnis des Kehlkopfes zur Mundhöhle eine wesentliche Rolle. Der Kehlkopf des Menschen sitzt verhältnismässig tief, so dass der Luftstrom ohne weiteres durch den Mundraum gelenkt werden kann. Bei vielen Säugern, einschliesslich Halbaffen und Neuweltaffen, ist dieser Zustand noch nicht erreicht, sondern der Kehlkopf ragt so weit in den Rachen hinauf, dass er vom Gaumensegel umschlossen wird und sein Eingang unmittelbar mit dem Nasenrachenraum in Verbindung tritt, von der Mundhöhle jedoch abgeschlossen bleibt. Diese Verbindung des Kehlkopfes mit dem Nasenrachenraum ermöglicht eine ausschliessliche Nasenatmung, welche auch bei der Nahrungsaufnahme keine Unterbrechung findet. (Die Nahrung umwandert seitlich die Luftröhre, um zur Speiseröhre zu gelangen.) So zweckentsprechend diese Regelung im Sinne einer gleichzeitigen Atmung und Nahrungsaufnahme ist, so hinderlich ist sie für die Ausbildung einer artikulierten Stimme.

Die *Tieferlagerung* des Kehlkopfes, durch welche der den Kehllaut bewirkende Atmungsstrom einen vollen Anschluss an den Mundrachen erhält, beginnt schon weit vor der Hominidenstufe. Anfänge in der genannten Richtung finden sich (nach BERNSTEIN[1]) bereits unter den Cercopithecinen (Pavian). Beim Gibbon und den Menschenaffen erreicht der Abstieg schon ein menschenähnliches Stadium. Die Möglichkeit, die Mundorgane in die Lautbildung einzubeziehen, ist bei den letzteren also im Prinzip bereits vorhanden.

[1] H. BERNSTEIN, Abh. Senckenberg. naturforsch. Ges. Frankfurt *38*, 105–127 (1923), *Über den Kehlkopf der Primaten*. Vgl. ausserdem E. MEYER, Arch. Laryng. Rhinol. *12* (1902), und J. NEMAI Anatom. Hefte *59*, 257–291 (1921).

Auch im *Bau* des Kehlkopfes selbst sind bei den höheren Primaten bedeutende Fortschritte zu verzeichnen. Beim Gibbon und den Anthropomorphen erreicht die Differenzierung der Muskulatur des Larynx schon eine weitgehende Annäherung an menschliche Verhältnisse. Besonders erwähnt sei der Fortschritt bei den Stimmbändern. Diese sind bei den Affen der niederen und mittleren Gruppen noch kaum muskulös und zeigen eine mehr wulstförmige Beschaffenheit oder sind mit membranösen Rändern ausgestattet. Letztere können durch die vorbeistreichende Luft zwar in starke, aber wenig regulierbare Schwingungen versetzt werden. Bei höheren Affen wird das

Abb. 1. Luftsack des männlichen Orang-Utans. (Nach DENIKER und BOULART, aus M. WEBER, *Die Säugetiere* [Jena 1927].) Das unförmige Gebilde entsteht durch Aneinanderlagerung und Verschmelzung der beiden Ausstülpungen der Morgagnischen Taschen. Der rechte Sack ist geöffnet und zeigt die Scheidewand. Seitliche Divertikel (*a*) reichen in die Achselhöhlen. Hintere Ausläufer erstrecken sich zwischen den Nackenmuskeln bis zur Wirbelsäule.

Stimmband selbst muskulös, und bei den Gibbons treten die membranartigen Säume völlig zurück (BERNSTEIN). Dem entspricht, dass die Gibbons, wie erwähnt, über die modulationsfähigste Stimme verfügen. Dagegen weisen die Stimmbänder der Schimpansen wieder stärkere membranöse Ränder auf, was zweifellos einen Rückschritt darstellt.

Etwas eingehender müssen wir uns mit den blasenförmigen Anhängen des Kehlkopfes, den *Luftsäcken*, befassen. Die paarigen Aussackungen der Morgagnischen Taschen findet man bei Affen aller Gruppen. Bei den Breitnasen und den Cercopithecinen zeigt der Kehlkopf ausserdem noch eine mediane Lufttasche, welche unterhalb des Kehldeckels entspringt. Die Funktion der Kehlkopfaussackungen ist nicht bei allen Affen geklärt; oft dienen sie, teils als Resonanzorgane, der Stimmverstärkung.

Das verbreitete Vorkommen der Anhänge der Morgagnischen Taschen in allen Primatengruppen macht ihr Vorhandensein auch bei den Vorformen des Menschen wahrscheinlich. Auch kommen Appendizes beim Menschen hin und wieder als pathologische Bildungen vor, sind dann aber die Ursache von Sprachstörungen. Besonders forcierte Expirationen (zum Beispiel bei Trompetern) scheinen ihre Entstehung zu begünstigen. Sicher ist, dass die Appendizes bei den Vorformen des Menschen nur in bescheidener Form angelegt sein konnten und dass das Fortschreiten des Stimmgebrauches in der menschlichen Richtung ihre Rückbildung erforderte. – Das menschliche Kehlorgan beruht auf der Vervollkommnung des Muskel- und Nervenapparates, durch welche eine umfangreiche Lautmodulation ermöglicht wird. Die Kehlkopfanhänge bedingen, wie wir im folgenden sehen werden, eher eine Primitivisierung der Stimme.

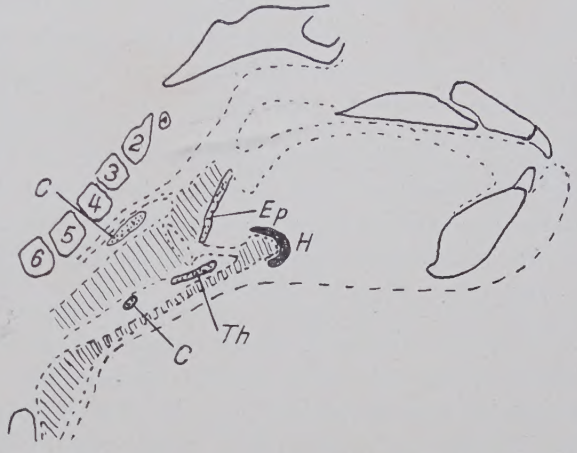



Abb. 2. Kehlorgan eines weiblichen Schimpansen. (Aus H. BERNSTEIN, Abh. Senckenberg. Naturf. Ges. *38* [1923].) Knochen und Knorpelteile sind durch ausgezogene, die Weichteile durch unterbrochene Linien bezeichnet, der Luftraum des Kehlkopfes und seiner Nebenräume ist durch Schraffierung hervorgehoben. *C* = Ringknorpel, *Ep* = Kehldeckel, *H* = Zungenbein, *Th* = Thyroid, Nr. 1–6 = Halswirbel. Erläuterung siehe Text.

Bei den Affen erreichen die Luftsäcke oft eine erhebliche Grösse, dabei wird nicht selten auch das Zungenbein in das Hohlraumsystem einbezogen. Bei Neuweltaffen wie auch bei einigen Cercopithecinen dringt der mediane Kehlsack in den ausgehöhlten Zungenbeinkörper ein. Einen Extremfall in dieser Beziehung bilden die Brüllaffen, bei welchen das Zungenbein zu einer grossen blasenförmigen Kapsel aufgetrieben ist, welche als Resonanzorgan bei den genannten kilometerweit hörbaren Brüllorgien wirkt.

Unter den höheren Primaten haben nur die Gibbons einigermassen bescheidene und unkomplizierte Kehlkopfanhänge, während sich die Anthropomorphen durch wirklich exzessive Gebilde auszeichnen. Einen wahrhaft monströsen Luftsack besitzt der Orang-Utan, der stimmärmste unter den Menschenaffen (Abb. 1). Das Orangjunge, das anfangs noch unbedeutende Anhänge aufweist, bringt weinende und schreiende Laute hervor. Die erwachsenen Tiere galten lange für stumm, bis BRANDES[1] von einem äusserst selten zu hörenden nächtlichen «Gesang» berichtete: einem minutenlang fortgesetzten vibrierenden Brummen, ab und zu von lauten Brülltönen unterbrochen. Affekt-

[1] G. BRANDES, *Buschi, Vom Orangsäugling zum Backenwülster* (Leipzig 1939).

laute vermisst man beim Orang. – Der Gorilla, mit ebenfalls grossem, wenn auch nicht ganz so umfangreichem Sack, verfügt über 4–5 verschiedene, stimmlich recht primitive Lautäusserungen; zudem ist er sehr wenig stimmfreudig.

Abbildung 2 zeigt das Kehlorgan des Schimpansen, dessen Stimmvermögen oben schon charakterisiert wurde. Beim Schimpansen wächst ein Ausläufer des linken Luftsackes in das Zungenbein ein, das eine Aushöhlung aufweist. Es muss überraschen, hier eine den niederen Affen analoge Spezialisierung des Kehlorgans zu finden. Nur ist es beim Schimpansen ein Ausläufer einer Morgagnischen Tasche, bei den ersteren der mediane Luftsack, welcher mit dem Zungenbein in Verbindung tritt. Beim Schimpansen hat dieser Prozess aber bestimmte Konsequenzen. Während bei den tiefer stehenden Affen das Zungenbein noch in fester Verbindung mit den Larynxknorpeln steht, ist es beim Schimpansen schon, wie beim Menschen, frei beweglich dem Kehlkopf vorgelagert. Durch das Eindringen des Luftsackes büsst es seine Bedeutung, eine gut bewegliche Unterlage für die Zunge abzugeben, teilweise wieder ein (siehe Kapitel Mundorgane). – Bernstein kam zu dem Schluss, dass der Kehlkopf des Schimpansen, trotzdem er im ganzen noch etwas menschenähnlicher erscheint als derjenige des Gibbons, in einer Reihe von Einzelheiten deutliche Rückschritte aufweist (Verbreiterung der Stimmbandsäume, Vergrösserung der Kehlsäcke, Festlegung des Zungenbeines u.a.).

Wir sehen, dass sich die Kehlorgane bei allen drei Menschenaffen durch beträchtliche Spezialisierungen sekundärer Art auszeichnen. Von einem ursprünglichen Zustand, wie er als Ausgangspunkt für die menschliche Evolutionsrichtung in Frage käme, sind sie weit entfernt. Die anfangs besprochenen Fortschritte (muskulöse Ausstattung und Tieferlagerung des Kehlkopfes), die einen höheren Stimmgebrauch ermöglichen könnten, haben durch die abwegige Kehlsackentwicklung offenbar ihren Wert wieder verloren. Damit sind wir der Frage, weshalb bei den Anthropomorphen eine Vorstufe der menschlichen Stimme nicht gefunden wird, wenigstens in einem Punkt nähergekommen.

### *Mundorgane und Sprache*

Erst die Mundorgane machen den Stimmlaut zum Sprachlaut. Die Vokale werden durch verschiedenartige Formungen des Mundraumes im ganzen hervorgebracht. Die Konsonanten sind Reibungsgeräusche, die der Luftstrom im Zusammenwirken mit den Mundorganen erzeugt; man unterscheidet dementsprechend Lippen-, Zahn-, Gaumenlaute usw. Die Mundteile des Menschen übernehmen somit eine grundsätzlich neue, ausserhalb der Ernährungsbedürfnisse liegende Funktion. Die Tatsache, dass ein – wenigstens teilweiser – *Funktionswechsel* der menschlichen Mundwerkzeuge zu verzeichnen ist, wird oft nicht genügend gewürdigt. Auch heute noch wird, besonders in Schul- und Lehrbüchern, das menschliche Gebiss häufig kurzerhand als ein «Allesfressergebiss» bezeichnet, obwohl nicht schwer zu erkennen ist, dass viele von dessen Besonderheiten mehr auf die Sprache als auf die Ernährung bezogen werden müssen. Sind doch die Aufgaben des Gebisses im Dienste der Ernährung gerade beim Menschen auf ein Mindestmass eingeschränkt. – Das Einzigartige des in Rede stehenden Funktionswechsels wird sogleich klar, wenn wir überlegen, dass der Ernährungsvorgang zum Ursprünglichsten, die Sprache hingegen zum letzten von dem gehört, was in der Reihe der Lebewesen überhaupt entstanden ist.

Die besondere Eigenart der menschlichen Mundbildung gegenüber jener der Säugetiere sei hier durch eine kurze Gegenüberstellung der Unterschiede gekennzeichnet (wobei die Affen zunächst ausser Betracht bleiben):

*Säugetiere.* Die Kiefer, zu deren Aufgaben nicht nur die Zerkleinerung, sondern auch das Ergreifen der Nahrung gehört, treten weit nach vorne. Der Zahnbogen besitzt in diesem Zusammenhang eine schmale, langgestreckte Form; der Gaumen ist flach. Die dadurch sehr enge Mundhöhle wird von der Zunge fast ganz ausgefüllt, gewährt derselben also kaum einen Spielraum. Die Zunge selbst – sie wird hauptsächlich zum Lecken gebraucht – ist von langgestreckter Form und sehr dehnungsfähig. Ihr Fundament, das Zungenbein, befindet sich mit den Kehlkopfknorpeln in fester Verbindung. Die Zähne zeigen meist sehr unterschiedliche Grösse; der Ernährungsweise entsprechend sind bestimmte Teile des Gebisses verstärkt, andere rückgebildet, und es gibt kaum ein Gebiss, dessen Zahnreihe im vorderen Teil völlig lückenlos wäre. Auch stehen die Schneidezähne gewöhnlich nicht aufrecht im Kiefer, sondern sind mehr oder weniger nach vorne gerichtet.

*Mensch.* Durch die Verkürzung der Kiefer, die *breit* hufeisenförmige Gestalt des Zahnbogens und vor allem durch eine beträchtliche Hochwölbung des Gaumendaches entsteht beim Menschen eine zwar kurze, aber weiträumige Mundhöhle, die sogenannte Vokalhöhle. In dieser verfügt die Zunge über einen bedeutenden Spielraum. Die Zunge selbst ist bis in die Spitze hinein von kräftigen Muskelbündeln durchzogen und zu äusserst vielseitigen Bewegungen befähigt. Das Zungenbein, das sich aus dem Zusammenhang mit den Kehlkopfknorpeln gelöst hat, bietet der Zunge eine bewegliche Unterlage. – Das menschliche Gebiss zeigt bezüglich der Höhe der Zähne ein einzigartiges Gleichmass. Die Reihe der Vorderzähne ist lückenlos geschlossen (was Lücken für die Sprache bedeuten, wird beim Fehlen eines Vorderzahnes spürbar). Die für den Menschen bezeichnende senkrechte Stellung der Schneidezähne im Kiefer ist für die Bildung der Konsonanten von entscheidender Bedeutung.

Die artikulierte Stimme ist eng an die besondere Struktur der menschlichen Mundorgane gebunden. Anfänge zu einer Umbildung in der menschlichen Richtung lassen sich schon auf frühen Stufen der Primatenreihe erkennen. Die Verkürzung der Kiefer wird durch eine Verringerung der Prämolaren eingeleitet. Auf der Vorprimatenstufe besitzt das Gebiss 4 Prämolaren; Lemuren und Neuweltaffen haben noch 3, die

Altweltaffen bis zum Menschen 2 Prämolaren. Was den ursprünglichen Anlass zu dieser Verkürzung gebildet haben mag, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen; ein Hauptfaktor dürfte aber mit hoher Wahrscheinlichkeit die beginnende Aufrechtstellung des Körpers gewesen sein (unter den rezenten Halbaffen wird diese durch den Koboldmaki dokumentiert).

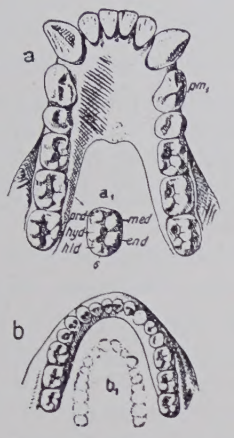



Abb. 3. Unterkiefer: *a* vom Gorilla, *b* vom Menschen. 1/3 natürliche Grösse. (Aus A. Naef, *Die Vorstufen der Menschwerdung* [Jena 1933].) – (Die Nebenfigur $b_1$ bezieht sich auf den Neuweltaffen *Callicebus* und zeigt einen primitiveren Typus des Zahnbogens.)

Durch die Änderung der Körperhaltung werden die Brustgliedmassen für die Greiftätigkeit frei. In Verbindung damit tritt für die Kiefer eine wesentliche Entlastung ein, woraus die Möglichkeit ihres Zurücktretens entsteht. Mit der Kieferverkürzung verknüpft sich schon bald auch eine relative Verbreiterung des Zahnbogens. Das Gaumendach, bei den Halbaffen noch flach, den Neuweltaffen nur schwach gewölbt, erfährt bei den Altweltaffen durch Erhöhung der Kieferleisten eine beträchtliche Hochwölbung. Durch diesen Vorgang wird der Mund als Vokalhöhle veranlagt. Tatsächlich hört man vom Pavian erstmals echte, das heisst durch eine bestimmte Mundformung hervorgebrachte Vokallaute (ein voll klingendes «ho ho...»). Unter den höheren Primaten sind Gibbon und Schimpanse zu einigen Vokallauten befähigt. Das Zungenbein, das auf früheren Stufen noch in fester Verbindung mit den Kehlkopfknorpeln steht, wird ebenfalls bei den Cercopithecinen schon etwas beweglicher; bei Gibbon und Schimpanse (vgl. aber die früher genannte Einschränkung) ist es dem Kehlkopf frei vorgelagert. Bemerkt sei auch, dass der Zahnbogen junger Menschenaffen mit fertigem Milchgebiss eine kurze und breite Form aufweist, die der des Menschen recht ähnlich ist.

Bisher wurden allein diejenigen Umkonstruktionen im Bereich des Mundes genannt, welche in der Primatenreihe in menschlicher Richtung weisen. Nun ist aber auch bezüglich der Mundorgane der primäre Entwicklungsverlauf häufig von sekundären Spezialisierungen durchkreuzt worden. In vielen Primatengruppen treffen wir Arten, die mit stark vorspringenden, wehrhaften Kiefern ausgestattet sind. Dies gilt besonders auch für die drei Menschenaffen. Am krassesten erscheint die Vergrösserung und Vergröberung der ganzen Kieferpartie und der einzelnen Zähne bei Gorilla und Orang-Utan, etwas gemässigter beim Schimpansen. Es wird wohl heute niemand mehr in Abrede stellen, dass die massigen Kiefer der Menschenaffen als ein sekundärer Erwerb angesehen werden müssen und von dem urtypischen Zustand auf der Anthropomorphenstufe beträchtlich abweichen (vgl. hierzu auch Naef[1]). Die sekundäre Kiefervergrösserung ist mit einer Reihe von Einzelheiten verknüpft, welche für das Stimmproblem von grösster Bedeutung sind. Der gewölbte Gaumen erfährt bei allen drei Arten im vorderen Teil des Mundes eine Abflachung. Durch die – besonders bei männlichen Tieren – sehr verstärkten Eckzähne entsteht eine Winkelung des Zahnbogens, welche in der Primatenreihe durchaus abseitig anmutet (Abb. 3). Zugleich bedingt das Hervortreten der Eckzähne entsprechende Lücken im vorderen Teil des Gebisses. Die Schneidezähne der Menschenaffen sind nach vorne gerichtet, am auffälligsten beim Schimpansen, was wiederum kein ursprüngliches Merkmal darstellt, sondern eine Anpassung an eine Greiffunktion der Kiefer, vielleicht auch an das Ausschaben von Früchten. – Alle die genannten Umbildungen machen die Mundregion für die Lautbildung wieder ungeeignet.

Mensch und Menschenaffen divergieren sehr auffällig in der Entwicklung der Mundwerkzeuge. Die menschlichen Mundorgane bildeten sich im Dienste der Stimme weiter und setzten damit die – auch in der rezenten Primatenreihe noch deutlich erkennbare – Evolutionsrichtung konsequent fort. Bei den Menschenaffen hat dagegen, trotz den bereits vorhandenen Errungenschaften, eine einseitig auf Ernährung und wehrhafte Ausstattung gerichtete sekundäre Kieferumbildung den Sieg über die Lautbildungsfähigkeit davongetragen und eine Verarmung der letzteren bewirkt.

### *Schlussfolgerungen*

Die geschilderten Tatbestände lassen erkennen, dass die auf eine artikulierte Stimme bezüglichen Umbildungen von Kehlkopf und Mundorganen nicht erst mit der Hominidenstufe, sondern schon verhältnismässig früh in der Primatenreihe ihren Anfang nehmen. Wir sahen, dass insbesondere die Anthropomorphen im Prinzip schon wesentliche Voraussetzungen für einen höheren Stimmgebrauch erreichten. Durch die Vergrösserung der Kehlkopfanhänge und durch die wehrhafte Kieferausstattung – beides sekundäre Spezialisierungen der rezenten Arten – ist allerdings der Wert der in Richtung einer artikulierten Stimme erreichten Fortschritte wieder hinfällig geworden.

[1] A. Naef, *Die Vorstufen der Menschwerdung* (Jena 1933).

Unsere Befunde erscheinen geeignet, manche Probleme der menschlichen Herkunft deutlicher als bisher erkennen zu lassen. Von den Menschenaffen muss gesagt werden, dass sie längst eine Entwicklungsrichtung eingeschlagen haben, welche von der menschlichen Linie wegführt (vgl. KIPP[1]). Davon macht auch der Schimpanse keine Ausnahme. Auch andere Tatsachen, wie zum Beispiel die Reduktion des Daumens, belegen diese Auffassung. Vielleicht zeigt sich aber auf dem Gebiet der Stimmorgane und der Lautäusserungen am deutlichsten, dass die Anthropomorphen gerade diejenigen Möglichkeiten, welche eine Fortentwicklung in menschlicher Richtung gestatten könnten, eingebüsst haben. Als Modell einer Vorstufe des Menschen sind sie deshalb – wenn falsche Vorstellungen vermieden werden sollen – recht wenig geeignet. Auch die sogenannte «gemeinsame Stammform, welche dem Schimpansen nur nahesteht, aber nicht in allen Einzelheiten wie dieser aussah», dient einer wirklichen Klärung wenig, solange konkrete Angaben über die in der Frage der Menschenwerdung wichtigen Besonderheiten dieser Stammform nicht gemacht werden. Unsere Ergebnisse bei den Stimmorganen lassen keinen Zweifel zu, dass die gemeinsame Vorform prinzipiell andere Fähigkeiten und Möglichkeiten besessen haben muss, als man sie bei einem der heutigen Anthropomorphen findet.

Das auf dem Gebiete der Stimmentwicklung konstatierbare Evolutionsbild weist manche sehr bemerkenswerte Züge auf. Wichtige Voraussetzungen für die stimmliche Evolution sind wohl namentlich durch die beginnende Aufrichtung des Körpers entstanden. Im weiteren macht der Gesamtverlauf, trotzdem er nach den heutigen Formen des Primatenstammes nur näherungsweise entziffert werden kann, durchaus den Eindruck einer *gerichteten* Entwicklung. Um so rätselhafter erscheint es, dass der Mensch als einziges Wesen die Früchte des langen Evolutionsweges geerntet hat, indem er ein reiches Lautbildungsvermögen erreichte, das dann die Grundlage für die Sprachentstehung bilden konnte, wogegen bei einer Reihe anderer Formen unzweifelhafte Rückschritte der stimmlichen Möglichkeiten zu verzeichnen sind. – Es sei versucht, einiges zur Klärung dieses Evolutionsbildes beizutragen.

Es ist zu beachten, dass die stimmliche Entwicklung drei im Grunde sehr heterogene Bezirke des Säugerorganismus einschliesst: Gehirn, Kehlkopf und Mundorgane. Jeder der genannten Bezirke hatte eine längere Entwicklung durchzumachen, die effektiven Fortschritte des Stimmvermögens sind aber an die *Koordinierung* der Evolutionsvorgänge der drei Gebiete gebunden. Für sich allein konnte keines derselben eine wesentliche Erweiterung der stimmlichen Fähigkeiten bringen.

Wie wir an den «missglückten» Fällen sehen, hatte die erfolgreiche Koordinierung beträchtliche Schwierigkeiten zu überwinden. Man wird wohl nicht fehlgehen, wenn man den Mundwerkzeugen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Bedeutung beimisst. In der Doppelrolle, welche die Mundorgane zu erfüllen haben, verbirgt sich eine Diskrepanz von ungewöhnlichem Ausmass. Was der Lautbildung zugute kommt, geht den Wehr- und Ernährungsbedürfnissen ab, und umgekehrt. Indem besonders bei den Anthropomorphen die Wehr- und Ernährungsfunktionen in den Vordergrund traten, mussten notwendigerweise die auf stimmlichem Felde bereits vorhandenen Errungenschaften ihre Bedeutung wieder verlieren. Am Kehlkopf, der für sich allein keinen wesentlichen Fortschritt bringen konnte, mag in der Folge dann der hypertrophe Ausbau der Kehlsäcke eingesetzt haben. So vermitteln uns die Verhältnisse bei den Menschenaffen eine instruktive Vorstellung von den Klippen, welchen das Werden der artikulierten Stimme ausgesetzt war.

Hervorzuheben ist noch, dass die Umbildung der Mundorgane im Dienst der Stimme in einem beachtenswerten Gegensatz zu den sonstigen Anpassungen gerade dieser Teile steht. Die Formung der Mundwerkzeuge für Wehr-, Greif- und Ernährungsfunktionen bezieht sich auf elementare Daseinsnotwendigkeiten, welchen das Lebewesen unterworfen ist. Alle die verschiedenartigen Kieferformen, die die Säugetierwelt bietet, sind das Ergebnis der Anpassung an äussere Lebensumstände. Nur bei den auf die Lautbildung bezüglichen Umkonstruktionen ist das nicht der Fall. Hier handelt es sich um eine Entwicklung, die der sonst so generell herrschenden «Anpassungstendenz» entgegen lief, jedoch aufs deutlichste einem erhöhten Innenleben dient, dessen Grundlage die zerebralen Fortschritte sind. – So darf gesagt werden, dass die Entstehung der Sprachfähigkeit um so erstaunlicher erscheint, je mehr man in ihre Evolutionsgeschichte eindringt.

*Summary*

(1) The evolution of the voice and of the vocal organs producing the articulated human speech, is dealt with.

(2) The transformation of the anatomical structure of the larynx and the organs of the oral cavity serving articulation, does not begin with the Hominids but at the more primitive stages of the Primates.

(3) The fact that anthropomorphous apes have but few possibilities of voice is due to supplementary specialisations of their vocal instruments.

(4) The resulting problems of evolution are discussed.

[1] F. A. KIPP, *Höherentwicklung und Menschwerdung* (Stuttgart 1948).

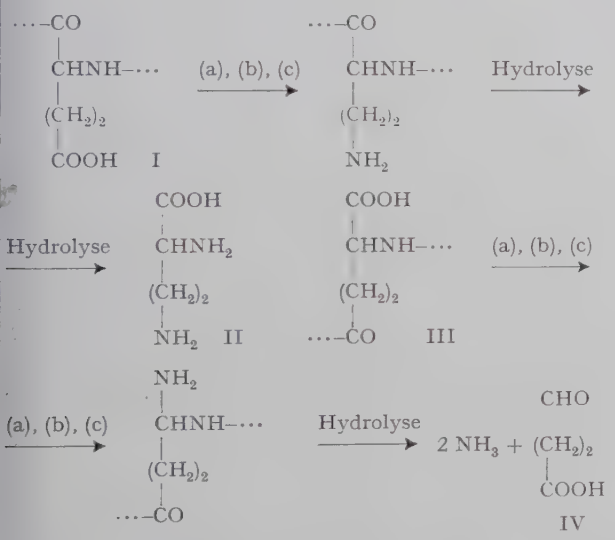
# Brèves communications - Kurze Mitteilungen
# Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

## Über die Bindungsart der Glutamylreste im *p*-Aminobenzoylpolypeptid aus Hefe

RATNER und Mitarbeiter[1] haben aus Hefe ein N-*p*-Aminobenzoyl-polypeptid isoliert und auf Grund analytischer Belege festgestellt, dass die Peptidkette dieser Verbindung aus 10–11 Glutaminsäureresten und einem Rest einer nicht identifizierten Aminodicarbonsäure aufgebaut ist.

Wir haben jetzt die Bindungsart der Glutamylreste an einem aus Hefe selbst isolierten Präparat, das auf analytischem Wege mit dem Ratnerschen Polypeptid identifiziert werden konnte, aufzuklären versucht, und zwar mit Hilfe einer papierchromatographischen Modifizierung der Methode, die zur Konstitutionsermittlung der nativen D-Polyglutaminsäure diente[2]. Zu diesem Zwecke wurde aus dem Polypeptid (25 mg) sein Methylester bereitet[3] (a), dieser in das Polyhydrazid übergeführt (b), das zuerst nach CURTIUS abgebaut (c) und danach der Säurehydrolyse unterworfen wurde. Es ist zu erwarten, dass durch diesen Abbau aus α-Glutamylresten (I) α,γ-Diaminobuttersäure (II), aus γ-Glutamylresten (III) hingegen β-Formylpropionsäure (IV) entsteht:




Ein Teil des salzsauren Hydrolysats wurde nach Entfernung der anorganischen Salze[4] und entsprechender weiterer Vorbereitung papierchromatographisch auf Aminosäuren untersucht. (Abb. 1, Lösungsgemisch: Butanol–Eisessig–Wasser; Entwicklung mit Ninhydrin). Der andere Teil des Hydrolysats wurde mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin versetzt, dann mit Äther extrahiert, der Abdampfrückstand der Ätherlösung in absolutem Alkohol gelöst und der Papierchromatographie unterworfen (Abb. 2. – Lösungsgemisch: mit 3% wässerigem Ammoniak gesättigtes Butanol).

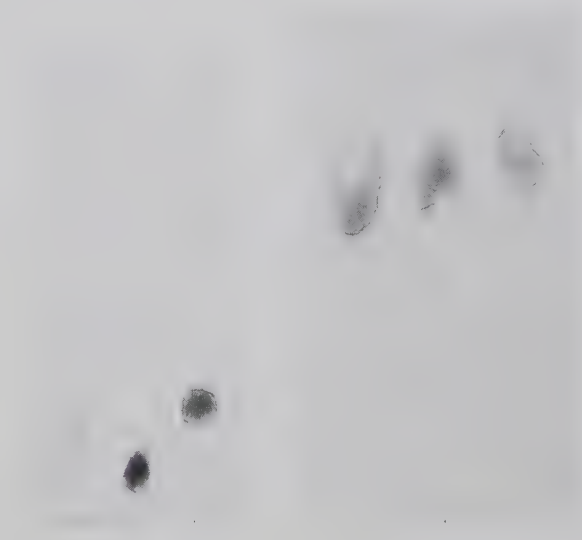


Abb. 1. 1. Hydrolysat des abgebauten Polypeptids. 2. α,γ-Diaminobuttersäure. 3. Glutaminsäure.

Abb. 2. 1. Dinitro-Phenylhydrazon aus dem abgebauten Polypeptid. 2. Synthetisches β-Formylpropionsäure-dinitrophenylhydrazon. 3. 1 + 2.

Es ist aus den Chromatogrammen ersichtlich, dass im Hydrolysat nur β-Formylpropionsäure und eine Spur von Glutaminsäure aufzufinden ist, jedoch keine α,γ-Diaminobuttersäure. Daraus kann man schliessen, dass in Polypeptid nur γ-Glutamylbindungen enthalten sind. Das Erscheinen einer Spur von Glutaminsäure im Hydrolysat dürfte nicht auf eine Verzweigung der Peptidkette, sondern eher auf die unvollständige Umsetzung des Methylesters zum Polyhydrazid (das noch einen Methoxylgehalt von 0,6% aufwies) zurückgeführt werden.

Dass γ-Glutamylbindungen für das Polypeptid kennzeichnend sind, steht mit seinen Eigenschaften in gutem Einklang: es zeigt keine Biuretreaktion und ist im Wasser sehr leicht löslich.

Aus enzymatischen Untersuchungen wurde bereits darauf geschlossen, dass in der Peptidkette des *p*-Aminobenzoyl-Polypeptids, CF-Konjugats und Vitamin-$B_c$-Konjugats eine weitgehende Ähnlichkeit der Konstitution bestehen dürfte[1]. Eine Untersuchung dieser Na-

[1] S. RATNER, M. BLANCHARD, A. F. COBURN und D. E. GREEN, J. Biol. Chem. *155*, 689 (1944). – S. RATNER, M. BLANCHARD und D. E. GREEN, J. Biol. Chem. *164*, 691 (1946).

[2] J. KOVÁCS und V. BRUCKNER, Research *5*, 194 (1952); Chem. Soc. *1952*, 4255. – J. KOVÁCS, V. BRUCKNER und K. KOVÁCS, Chem. Soc. *1953*, 145.

[3] H. FRAENKEL-CONRAT, J. Biol. Chem. *161*, 259 (1945).

[4] E. CONSDEN, A. H. GORDON und A. J. P. MARTIN, Biochem. J. *41*, 590 (1947).

[1] E. S. SIMS und J. R. TOTTER, Federation Proc. *6*, 291 (1947). – B. L. HUTCHINGS und J. H. MONTS, *Vitamines and Hormones*, Bd. VI., S. 23 (New York, 1948). – W. M. DOCTOR und J. R. COUCH, J. Biol. Chem. *200*, 227 (1953).

turstoffe nach der hier angegebenen Methode wäre nun um so mehr angezeigt, da in der Pteroyl-Triglutaminsäure, die mit diesen Verbindungen in mancher Beziehung nahe verwandt ist, die $\gamma$-Glutamylbindungen durch Synthese bereits bewiesen wurden[1].

Eine ausführliche Mitteilung erscheint in den Acta Chim. Hung.

I. Kandel und M. Kandel

*Organisch-Chemisches Institut der Universität Budapest, den 6. Juli 1954.*

*Summary*

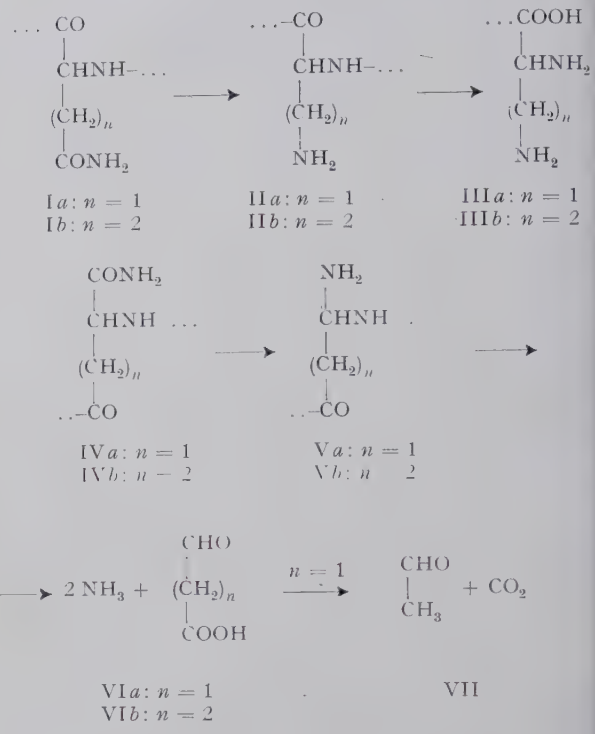
The method used previously for determination of the structure of native poly-D-glutamic acid was extended in modified form (paper chromatography) to the *p*-aminobenzoyl polypeptide of yeast. It was found that this polypeptide is built up of $\gamma$-glutamyl bonds.

[1] J. H. Boothe und Mitarbeiter, Am. Soc. *70*, 1098 (1948); *71*, 2304 (1949).

## Über die Bindungsart der amidierten Reste der $\beta$-Aminodicarbonsäuren in Eiweißstoffen

Es wird allgemein angenommen, dass in Eiweissen die nicht-*C*-endständigen Reste der $\alpha$-Aminodicarbonsäuren durch $\alpha$-Peptidbindungen eingebaut sind, während ihre $\omega$-Carboxyl-Gruppen entweder frei oder amidiert vorliegen. Eine Untersuchung von Haurowitz und Bursa[1], deren Ergebnisse von diesen Forschern als ein Beweis der Anwesenheit sehr weniger $\gamma$-Glutamylbindungen in einigen Eiweissen betrachtet wurde, fand bisher anscheinend wenig Beachtung, denn es wird auch neuerdings betont[2], dass ein Beweis von $\omega$-Peptidbindungen noch nicht geliefert wurde.

Wir haben jetzt über die Bindungsart der amidierten Reste der $\alpha$-Aminodicarbonsäuren in Gliadin und Chymotrypsinogen Näheres zu erfahren versucht, und zwar mit Hilfe der Methode, die zur Konstitutionsermittlung der natürlichen D-Polyglutaminsäure[3] und unlängst[4] auch der sogenannten Polyaspartsäure[5] mit Erfolg herangezogen wurde. Es wurden die kristallisierten Eiweißstoffe mit Natriumhypochloritlösung (Alkalität: ln; Menge: ber. auf die Amidgruppen) zuerst bei Raumtemperatur dem Hofmannschen Abbau unterworfen, dann nach Verbrauch des Hypochlorits mit Salzsäure hydrolysiert. Gemäss der Reaktionsfolge I $\rightarrow$ II $\rightarrow$ III ist aus Asparaginyl- bzw. Glutaminylresten (Ia bzw. Ib) die Entstehung von $\alpha,\beta$-Diaminopropionsäure (IIIa) bzw. $\alpha,\gamma$-Diaminobuttersäure (IIIb) zu erwarten, während Isoasparaginyl- bzw. Isoglutaminylreste (IVa bzw. IVb) laut Reaktionsfolge IV $\rightarrow$ V $\rightarrow$ VI und Decarboxylierung von VIa-Acetaldehyd bzw. $\beta$-Formylpropionsäure (VIb) liefern sollten:







Bei der Hydrolyse wurde zum Abfangen der flüchtigen Aldehyde eine salzsaure Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin verwendet, die man dann mit Äther extrahierte, desgleichen auch das Hydrolysat, das vorher mit demselben Reagens versetzt wurde. Der Rückstand der abgedampften Ätherlösungen wurde in absolutem Alkohol oder Essigester gelöst und dann papierchromatographisch untersucht (Lösungsgemisch: mit 3%igem wässrigen Ammoniak gesättigtes *n*-Butanol). Das ausgeätherte salzsaure Hydrolysat wurde von den anorganischen Salzen befreit[1], dann die Diaminocarbonsäuren nach der Methode von Block[2] abgesondert und papierchromatographisch untersucht.

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst:

| Gesuchtes Abbauprodukt | Gliadin | Chymotrypsinogen |
|---|---|---|
| Acetaldehyd . . . . . | + | 0 |
| $\beta$-Formylpropionsäure . . | + | 0 |
| $\alpha,\beta$-Diaminopropionsäure . | + | + |
| $\alpha,\gamma$-Diaminobuttersäure . . | + | + |

Vor Auswertung der Versuchsbefunde muss beachtet werden, dass Natriumhypochlorit freie $\alpha$-Aminosäuren zu den nächst niedrigeren Aldehyden abbaut[3] und denselben Abbau dieses Reagens auch an N-endständigen Aminosäureresten, jedoch nicht an Zwischengliedern der Peptidkette, bewirken kann[3]. Kontrollversuche zeigten, dass nach derselben alkalischen Einwirkung, denen das Gliadin während des Hofmannschen Abbaues ausgesetzt

[1] F. Haurowitz und F. Bursa, Biochem. J. *44*, 509 (1949).

[2] F. Sanger, *The Arrangement of Amino Acids in Proteins*, S.4, in M. L. Anson, K. Bailey und J. T. Edsall, *Advances in Protein Chemistry*, Bd. 7 (Academic Press, New York 1952). – P. Densuelle, *The General Chemistry of Amino Acids and Peptides*, S. 134, in H. Neurath und K. Bailey, *The Proteins*, Bd. I, Teil A (Academic Press, New York 1953).

[3] V. Bruckner, J. Kovács und H. Nagy, Chem. Soc. *1953*, 148. – V. Bruckner, J. Kovács und K. Kovács, Chem. Soc. *1953*, 1512. – V. Bruckner, J. Kovács und I. Kandel, Naturwiss. *40*, 243 (1953). – V. Bruckner, J. Kovács und G. Dénes, Nature *172*, 508 (1953).

[4] J. Kovács und I. Könyves, Naturwiss. *41*, 333 (1954).

[5] J. Kovács, I. Könyves und A. Pusztai, Exper. *9*, 459 (1953).

[1] E. Consden, A. H. Gordon und A. J. P. Martin, Biochem. J. *41*, 590 (1947).

[2] R. J. Block, Science *108*, 609 (1948).

[3] K. Langheld, Ber. *42*, 2360 (1909). – W. Sidney, S. W. Fox und M. W. Bullock, Am. Soc. *73*, 2754 (1951). – St. Goldschmidt und Ch. Steigerwald, Ber. *58*, 1346 (1925). – St. Goldschmidt E. Wiberg, F. Nagel und K. Martin, Ann. Chem. *456*, 1 (1927).

war, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin, die zur Bildung von VIb bzw. VII Anlass geben könnten, in der alkalischen Lösung nicht nachweisbar sind (DNP-Methode). Hingegen lässt sich im Säurehydrolysat des nach der alkalischen Vorbehandlung dinitrophenylierten Gliadins DNP-Asparaginsäure nachweisen. Es ist also Vorsicht geboten, aus der Entstehung des auch präparativ fassbaren Acetaldehyds beim Abbau des Gliadins auf die Anwesenheit von Isoasparaginylresten (IVa) zu schliessen.

Wir glauben aber schliessen zu können, dass im Gliadin nicht nur Asparaginyl- (Ia) und Glutaminylreste (Ib), sondern auch Isoglutaminylreste (IVb) vorliegen dürften, doch wäre es angezeigt, diesen Befund auch mit Hilfe einer anderen, noch aufzusuchenden Methode zu bestätigen.

Eine ausführliche Mitteilung erscheint in den Acta Chim. Hung.

J. Kovács, I. Kandel,
M. Kandel und V. Bruckner

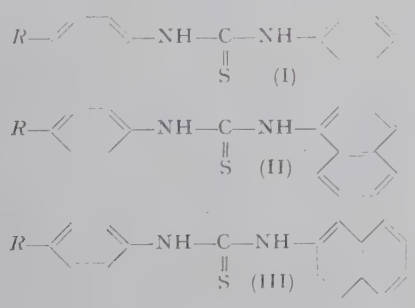
*Organisch-Chemisches Institut der Universität Budapest, den 6. Juli 1954.*

*Summary*

Gliadin and chymotrypsinogen, respectively, were treated with alkaline sodium hypochlorite solution equivalent to the carbonamide groups present, and then hydrolysed by acid. The proteins treated with dilute alkaline solution have been assayed in control experiments for their content of N-terminal amino acids. The degradation products identified by paper chromatography seem to indicate that in chymotrypsinogen the amido groups of the amino dicarboxylic acids represent asparaginyl (Ia) and glutaminyl (Ib) residues. In gliadin, besides these residues, the presence of isoglutaminyl residues (IVb) also seems to be probable.

## Activité tuberculostatique de nouvelles N,N′-diarylthiourées

Il a été montré récemment que certains dérivés *para*-disubstitués (I) de la N, N′-diphénylthiourée (ou thiocarbanilide) possèdent une activité tuberculostatique considérable *in vitro* et *in vivo*[1], et également une activité fongistatique notable. Dans ce même groupe des thiocarbanilides, on a trouvé également des substances




douées d'autres propriétés pharmacodynamiques intéressantes: ainsi, le 4-chloro-4′fluorothiocarbanilide (I; $R$ = Cl, $R'$ = F) et plusieurs composés analogues possèdent une activité antivirale[1], et, dernièrement, certains 4, 4′-dialkyloxythiocarbanilides ont été utilisés avec succès dans la chimothérapie de la lèpre[2].

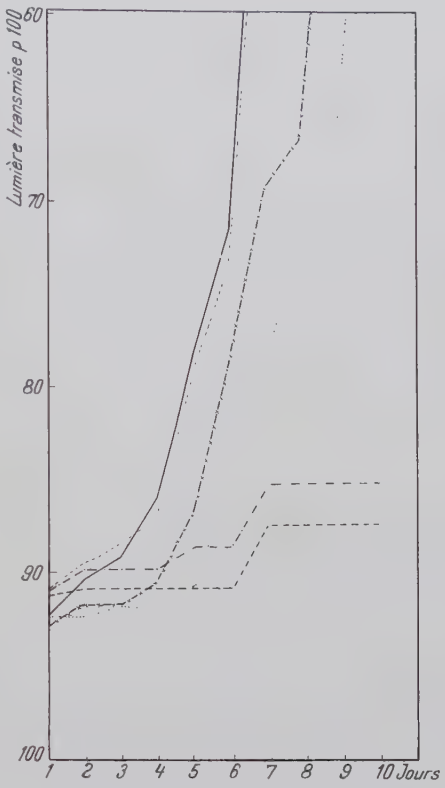



Figure 1. Témoin (culture glycérinée) ——
Témoin (culture ordinaire) – – – –
Concentration de la substance $10^{-5}$ – – – –, $10^{-6}$ –·–·–, $10^{-7}$, $10^{-8}$ ×–×–×–

Ces résultats nous ont conduit à examiner en détail les propriétés biologiques d'un grand nombre de N, N′-diarylthiourées Ar-NH-CS-NH-Ar′ dont les molécules possèdent des substituants en nombre et en position variés. Dans le présent travail, nous consignons les activités tuberculostatiques *in vitro* d'une série de ces composés, déterminées sur deux souches de bacilles tuberculeux: la souche H37RVD, et une souche à développement plus vigoureux provenant de l'hôpital de Brévannes. Le milieu de culture utilisé est celui de Dubos, et l'inhibition de la croissance des cultures est mesurée quantitativement par opacimétrie à l'aide d'un dispositif photométrique comprenant deux cellules photoélectriques en opposition. On peut de cette manière tracer des courbes d'opacité (pourcentage de lumière transmise) en fonction du temps.

Dans ces conditions, les résultats suivants ont été obtenus:

1° Trois des substances étudiées ne présentent d'activité notable sur les deux souches étudiées qu'à la concentration de $10^{-4}$(100 $\gamma$/ml): ce sont le 4-éthyl-

[1] R. L. Mayer, P. C. Eisman et E. A. Konopka, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *82*, 769 (1953). – C. F. Huebner, J. L. Marsh, R. H. Mizzoni, R. P. Mull, D. C. Schroeder, H. A. Troxell et C. R. Scholz, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 2274 (1953). – N. P. Buu-Hoï et N. D. Xuong, C. r. Acad. Sci. *237*, 498 (1953). – P. C. Eisman, E. A. Konopka, R. L. Mayer *et al.*, Amer. Rev. Tuberc. *70*, 121, 130 (1954).

[1] N. P. Buu-Hoï, P. Gley, N. D. Xuong et A. Bouffanais, C. r. Acad. Sci. *238*, 2582 (1954).

[2] N. P. Buu-Hoï, Internat. J. Leprosy *22*, 16 (1954).

2',3'-diméthylthiocarbanilide, le 4-bromo-4'-*n*-propylthiocarbanilide, et le 4-bromo-4'-*n*-butylthiocarbanilide.

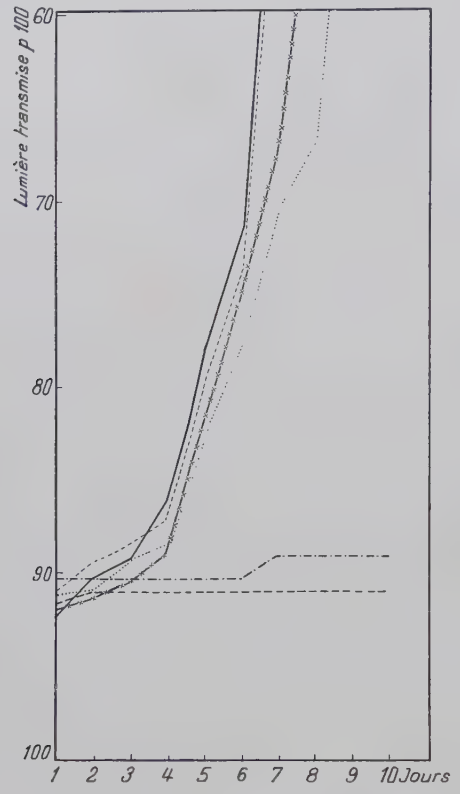



Figure 2. Témoin (culture glycérinée) ——
Témoin (culture ordinaire) – – – – –
Concentration de la substance $10^{-5}$ – – – –
$10^{-6}$ – · – · –
$10^{-7}$ · · · · · · · · · ·
$10^{-8}$ x–x–x–

2° Les vingt substances suivantes ont montré une activité notable à la concentration de $10^{-5}$($10\gamma$/ml):
4-éthylthiocarbanilide
4-éthyl-4'-méthylthiocarbanilide
4-éthyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide
4-méthoxy-4'-*n*-propylthiocarbanilide
4-éthoxy-4'-*n*-propylthiocarbanilide
2-éthoxy-4'-*n*-propylthiocarbanilide
4-isoamyloxy-4'-*n*-propylthiocarbanilide
2,4-diméthyl-4'-*n*-propylthiocarbanilide
2-phényl-4'-*n*-propylthiocarbanilide
4-*n*-butyl-4'-méthylthiocarbanilide
4-*n*-butyl-4'-méthoxythiocarbanilide
4-*n*-butyl-2'-méthoxythiocarbanilide
4-*n*-butyl-4'-éthoxythiocarbanilide
4-*n*-butyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide
N-(4-éthylphényl)-N'-α-naphtylthiourée (II; $R = C_2H_5$)
N-(4-éthylphényl)-N'-β-naphtylthiourée (III; $R = C_2H_5$)
N-(4-*n*-propylphényl)-N'-α-naphtylthiourée (II; $R = n\text{-}C_3H_7$)
N-(4-*n*-propylphényl)-N'-β-naphtylthiourée (III; $R = n\text{-}C_3H_7$)
N-(4-*n*-butylphényl)-N'-α-naphtylthiourée (II; $R = n\text{-}C_4H_9$)
N-(4-*n*-butylphényl)-N'β-naphtylthiourée (III; $R = n\text{-}C_4H_9$)

Deux de ces composés, le 4-*n*-butyl-4'-méthylthiocarbanilide et le 4-éthyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide, présentent une activité tuberculostatique notable à la concentration de $10^{-6}$($1\gamma$/ml), le 4-éthyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide montrant encore une certaine activité à la concentration de $10^{-7}$($0{,}1\gamma$/ml). Une comparaison de l'activité de ce dernier composé avec celle de l'hydrazide isonicotinique sur la souche Brévannes à croissance rapide a été effectuée. La figure 1 représente les courbes de croissance du bacille tuberculeux en présence de 4-éthyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide, et la figure 2 indique les courbes correspondantes obtenues avec l'hydrazide isonicotinique dans les mêmes conditions. Ces courbes montrent un phénomène intéressant, qui est que l'activité tuberculostatique *in vitro* du 4-éthyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide, si elle est moins prononcée que celle de l'hydrazide isonicotinique aux fortes concentrations ($10\gamma$/ml), devient tout à fait comparable à celle de cette hydrazide aux concentrations plus faibles.

En résumé, dans la série des thiocarbanilides aussi bien que dans la série des N-aryl-N'-naphtylthiourées, il est possible de trouver de nombreux composés possédant une activité tuberculostatique *in vitro* notable.

N. P. Buu-Hoï, N. D. Xuong,
N. H. Nam, J. M. Gazave,
J. Pillot et L. Schembri

*Institut du Radium de l'Université de Paris, le 18 octobre 1954.*

*Summary*

A number of new diversely substituted thiocarbanilides and N-aryl-N'-naphthylthioureas have been found which display pronounced tuberculostatic activity *in vitro*. One of these compounds, 4-ethyl-4'-isoamyloxythiocarbanilide, proved to be particularly effective.

## Canescin, ein mit Reserpin wirkungsgleiches Alkaloid aus *Rauwolfia canescens*

In ihrer 5. Mitteilung über Rauwolfiaalkaloide haben Stoll und Hofmann[1] erstmals ein neues Alkaloid, das Canescin, beschrieben und für dasselbe die Konstitution des 11-Desmethoxyreserpins vorgeschlagen. Es wurde darauf hingewiesen, dass Canescin ähnliche pharmakologische Eigenschaften aufweist wie das Reserpin. Diese letztere Angabe bezog sich auf Untersuchungsergebnisse aus unserem Laboratorium, und wir möchten dieselben nachstehend noch genauer präzisieren.

Schon die ersten Versuche mit dem neuen Alkaloid zeigten eine unverkennbare Ähnlichkeit seines Wirkungscharakters mit demjenigen des Reserpins[2]. Vor allem bewirkte Canescin bereits in relativ kleinen Dosen eine über viele Stunden anhaltende arterielle Drucksenkung, begleitet von mässiger Bradykardie. So betrug zum Beispiel die Drucksenkung nach 0,15 mg/kg Canescin i.v. im Durchschnitt von 10 Katzen 26% in der ersten, 45% in der zweiten, 58% in der dritten Stunde usw. Das Canescin wurde daher im Dosisbereich zwischen 0,05–0,25 mg/kg i.v. an mehr als 30 Katzen vergleichend

[1] A. Stoll und A. Hofmann, Mitteilung vom 5. Januar 1955 an den Herausgeber des J. Amer. chem. Soc. *77*, 820 (1955). Laut einer Privatmitteilung über einen Vortrag vom 12. Januar 1955 an der Columbia University, New York, wurde 11-Desmethoxyreserpin ebenfalls von Schlittler und Mitarbeitern isoliert.

[2] H. J. Bein, F. Gross, J. Tripod und R. Meier, Schweiz. med. Wschr. *83*, 1007 (1953).

mit Reserpin geprüft, wobei sich eine eindeutige qualitative und quantitative Übereinstimmung der depressorischen und bradykarden Wirksamkeit der beiden Alkaloide ergab. Die durchschnittlich ermittelte Reaktion des Blutdrucks bei Anwendung des einen Alkaloids bewegt sich stets innerhalb der Variationsbreite der Wirkung des anderen Alkaloids. Auch die blutdruckwirksamen Schwellendosen sind im Durchschnitt der Fälle für beide Alkaloide gleich gross. Wie Reserpin hemmt auch das Canescin die pressorische Adrenalinwirkung nicht, sondern steigert sie sogar gelegentlich. Auf die Atmung wirkt Canescin ebenso wie Reserpin deutlich hemmend, was besonders bei narkotisierten Tieren schon nach kleinen Dosen der Fall sein kann. Diese weitgehende pharmakodynamische Identität von Canescin und Reserpin bestätigt sich auch darin, dass die Wirkung beider Alkaloide durch Decerebrierung sowie durch Dekapitierung (Spinaltier) in gleicher Weise beeinflusst wird. Am Spinaltier fehlt die typische Kreislaufwirkung vollständig, während sie beim decerebrierten Tier weitgehend erhalten bleibt.

Nach diesen Ergebnissen konnte es nicht mehr überraschen, dass für das Canescin auch eine verengernde Wirkung auf die Pupille sowie ein allgemein sedativer Effekt nachweisbar sind, wie das in charakteristischer Weise beim Reserpin der Fall ist. In unseren diesbezüglichen Untersuchungen an Mäusen und Hunden lassen sich weder für die miotische noch für die sedative Wirkung signifikante Unterschiede zwischen Canescin und Reserpin finden.

Zusammenfassend ergibt sich also die interessante Tatsache, dass dem Canescin, das heisst dem 11-Desmethoxyreserpin, in jeder Beziehung die Eigenschaften des Reserpins zukommen. Dieser Befund ist nicht zuletzt deshalb von Bedeutung, weil er zeigt, dass gewisse Veränderungen am Reserpinmolekül ohne Verlust der spezifischen Wirksamkeit möglich sind.

A. Cerletti, H. Konzett und M. Taeschler

*Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz AG., Basel, den 7. Februar 1955.*

*Summary*

Canescine or 11-Desmethoxyreserpine, a new alkaloid isolated by Stoll and Hofmann from *Rauwolfia canescens* has been submitted to a comparative pharmacological study with Reserpine. The circulatory effects obtained with these two alkaloids can practically not be distinguished from each other. Like Reserpine also Canescine exhibits a sedative action and produces pupillary constriction.

## 19-Hydroxylation of $\Delta^4$-Androstene-3,17-dione and Dehydroepiandrosterone by Bovine Adrenals

Recently, it has been reported[1] that incubations with dehydroepiandrosterone (I) and $\Delta^4$-androstene-3,17-dione (II) with bovine adrenal homogenate preparations produced a wide galaxy of conversion products. The most abundant ones have been isolated and characterized as 11-$\beta$-hydroxyandrostenedione (IV), 6-$\beta$-hydroxyandrostenedione (V), 6-$\alpha$-hydroxyandrostenedione (VII), compound VIII tentatively identified as 6-$\alpha$,11-$\beta$-dihydroxyandrostenedione, and $\Delta^4$-androstene-3,11,17-trione (III). Furthermore, compound VI, a substance migrating as a single band in various paper chromatographic systems, has been characterized as follows: the elemental composition corresponded to a monohydroxylated androstenedione ($C_{19}H_{26}O_3$); m.p. 168–170°; $[\alpha]_D^{30} + 178° \pm 4°$ (c. 0·56 in chloroform); $M_D + 538$; $\tilde{\nu}_{min}^{solid}$ 3400 cm$^{-1}$ (O–H), 1725 cm$^{-1}$ (pentacyclic C = O), 1650 and 1620 cm$^{-1}$ (C = O, conjugated) (see Fig. 1); $\lambda_{max}^{MeOH}$ 242 m$\mu$ (log$\varepsilon$ 4·18), but no end absorption near 200 m$\mu$ in oxygen-free absolute ethanol[1]; $R_{tol}$[2] 1·35 cm/h visualized e.g. by the purple Zimmermann color characteristic of 17-keto-steroids. These data are compatible with the assumption

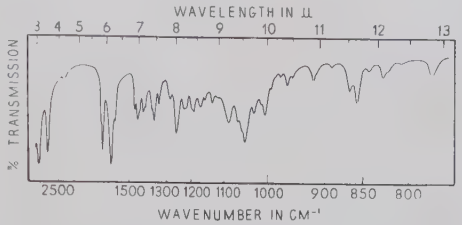



Fig. 1–Infrared spectrum of 19-hydroxyandrostenedione (VI) as solid film on a Perkin-Elmer 12-C spectrometer with a sodium chloride prism.

that during the bioconversion of II to VI the steroid nucleus was not altered, and the immediate problem was therefore to assign the correct position to the newly introduced hydroxyl group. Compound VI was not identical with any of the above isolated and the 11-$\alpha$-[3], 12-$\alpha$-[4], or 16-$\alpha$-[5]-monohydroxy-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione. This communication will advance evidence for the elucidation of the structure of *compound VI as being 19-hydroxy-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione* (see formulae).

Compound VI yielded upon exposure to acetic anhydride and pyridine or phosphoric acid at room temperature a syrupy acetate VI*a*:

$R_{lig}$ 0·7 cm/h; $\tilde{\nu}_{min}^{CS_2}$ 1737 cm$^{-1}$ (pentacyclic and acetate C = O), 1680 cm$^{-1}$ (conjugated C = O), 1225 cm$^{-1}$ ("acetate C = O stretch"); $\lambda_{max}^{EtOH}$ 239 m$\mu$; $[\alpha]_D^{26}$ $\sim +185°$ (chloroform).

The specific rotation decreased to $\sim +130°$ after high vacuum distillation of VI*a*, whereas the infrared spectrum remained almost identical; this would indicate that during the distillation a small amount of a strongly negative rotating substance was formed. Oxidation of

[1] A. S. Meyer, M. Hayano, M. C. Lindberg, M. Gut, and O. G. Rodgers, Acta Endocrin. *18*, 148 (1955).

[1] A. S. Meyer, H. Rosenkrantz, and G. Pincus, Amer. Chem. Soc. 126th Meeting, Abstract p. 53–0, New York, 1954. – The absence of an isolated olefinic bond in compound VI has been kindly confirmed by Dr. R. Norman Jones who examined the infrared absorption of the compound in chloroform solution with a Perkin-Elmer double-beam spectrophotometer with a sodium chloride prism (R. N. Jones, P. Humphries, E. Packard, and K. Dobriner, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 86 [1950]), and was unable to detect any evidence of an unsaturation other than the $\Delta^4$-bond.

[2] The *R*-values indicate the mobilities of the substances in the ligroin- and toluene-propylene glycol paper chromatographic system respectively as defined previously (A. S. Meyer, M. Hayano, M. C. Lindberg, M. Gut, and O. G. Rodgers, Acta Endocrin. [l. c.]). For compound II for instance a $R_{lig}$ 2·2 cm/h and for compound IV a $R_{tol}$ 4·0 cm/h have been determined.

[3] S. H. Eppstein, P. D. Meister, H. M. Leigh, D. H. Peterson, M. C. Murray, L. M. Reineke, and A. Weintraub, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 3174 (1954).

[4] Ch. Meystre and A. Wettstein, Helv. chim. Acta *32*, 1978 (1949).

[5] Dr. Josef Fried, private communication.

*Table I.*–Rate of Formaldehyde Elimination as Estimated by the Chromotropic Acid Color Formation

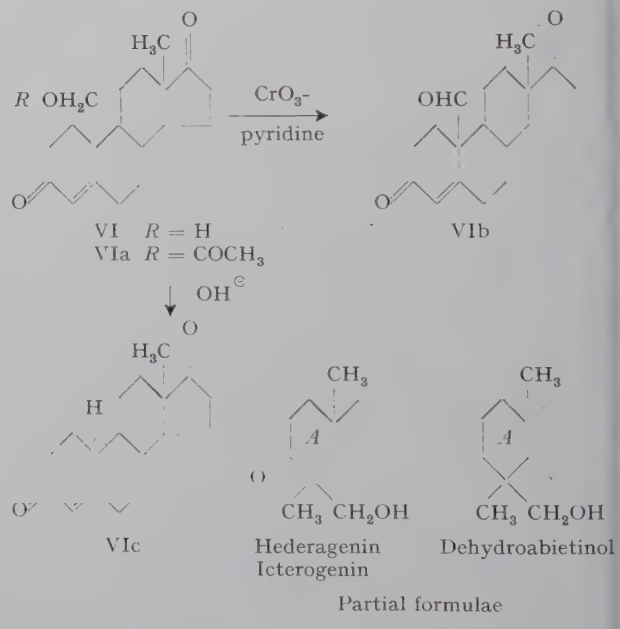
| Compound | Conditions* | Formaldehyde in per cent of theoretical after | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 10 min | 1·5 h | 3·0 h | 11·0 h |
| 19-Hydroxy-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione (VI) | 3·4 N KOH | | | 46 | |
| | 2·3 N KOH | | 28 | 34 | 47 |
| | 1·3 N KOH | 5 | 13 | 21 | 32 |
| | 0·15 N KOH | | | | 11 |
| | 2·0 N $H_2SO_4$ | | | 0 | |
| 19-Hydroxy-$\Delta^4$-pregnene-3,20-dione | 3·4 N KOH | | | 46 | |
| | 2·3 N KOH | | | 32 | 49 |
| | 1·3 N KOH | | | 18 | |
| 19-Hydroxy-3-oxo-$\Delta^4$-etienic acid | 2·3 N KOH | | 18 | 26 | 45 |
| | 1·3 N KOH | | 9 | 14 | |
| Methyl hederagonate | 1·3 N KOH | 14 | 45 | 66 | |
| | 0·4 N KOH | 8 | 26 | 37 | |
| | 0·03 N KOH | | 0 | | |
| Icterogenin | 1·3 N KOH | 17 | 49 | 65 | |
| | 0·15 N KOH | | | | 36 |

* ~ 80 $\mu$g of substance were reacted at 24° C in 0·2 ml ethanol with 1·0 ml aqueous potassium hydroxide solution of various strength (or acid) and then neutralized with phosphoric acid; further treatment essentially as described by Barton and de Mayo, J. Chem. Soc. 887 (1954).

compound VI with chromium trioxide in acetic acid did not result in a product with the expected mobility for the corresponding tricarbonyl derivative. However, the desired tricarbonyl compound (VIb) was obtained in approximately 40% yield when the chromium trioxide-pyridine complex[1] (20 mg $CrO_3$ in 1 ml of pyridine for 5.7 mg of compound VI) was allowed to react at room temperature for 15 min. Besides VIb, some $\Delta^4$-androstene-3,11,17-trione and two slower migrating non-acidic substances were recognized in the oxidation mixture. Compound VIb showed

$R_{lig}$ 0·65 cm/h; $\tilde{\nu}^{CS_2}_{min}$ 1735 cm$^{-1}$ (pentacyclic C = O), 1723 cm$^{-1}$ (C = O), 1680 cm$^{-1}$ (conjugated C=O). Reaction with pyridine alone did not alter the mobility of VI.

These findings permitted the exclusion of a number of positions as likely points of attachment for the hydroxyl group of VI. A tertiary position ($C_{(8)}$, $C_{(9)}$, or $C_{(14)}$) was precluded by the demonstrated conversion of VI to the acetate VIa and the tricarbonyl derivative VIb. Any secondary hydroxyl group on the steroid nucleus not influenced by another functional grouping (as in position $C_{(12)}$) would have been oxidized by the acidic chromium trioxide to the tricarbonyl derivative. The hydroxyl group in compound VI was not located at $C_{(15)}$ and $C_{(16)}$, since the additional infrared carbonyl frequency of VIb was of the hexacyclic or aliphatic type. Other positions for the hydroxyl group were excluded by the following considerations. In the ultraviolet, 4-hydroxy-$\Delta^4$-3-ketosteroids absorb, as enolized $\alpha$-diketones, most intensely near 280 m$\mu$[2] in contrast to compound VI. When exposed to alkaline ethanol, 2- and 7-hydroxylated $\Delta^4$-3-ketosteroids produce characteristic changes in their light absorption spectra[3] different from those observed with compound VI[4]. The latter data were also distinct from those of $\Delta^{1,4}$-androstadiene-3,17-dione[1] which would undoubtedly have been formed from a 1-hydroxylated derivative under those alkaline conditions[2]. Thus positions $C_{(18)}$ and $C_{(19)}$ remained for further examination. A vague indication which might have been interpreted in favor of a hydroxyl group at $C_{(19)}$ was the hypsochromic shift of 3 m$\mu$ observed in the ultraviolet[3] when compound VI was converted to the acetate VI*a*.




Partial formulae

[1] G. I. Poos, G. E. Arth, R. E. Beyler, and L. H. Sarett, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 422 (1953).
[2] L. Dorfman, Chem. Revs. *53*, 82 (1953).
[3] A. S. Meyer, manuscript in preparation.
[4] A. S. Meyer et al., Acta Endocrin. l. c.

[1] A. S. Meyer, manuscript in preparation.
[2] *Cf.* P. Stiebel and Ch. Tamm, Helv. chim. Acta *37*, 1094 (1954); see also [1] for a vinylogous instance.
[3] G. W. Barber and M. Ehrenstein, J. Org. Chem. *19*, 1758 (1954).

The interesting observation by BARTON and DEMAYO[1], that relatively mild basic conditions lead to formaldehyde elimination with methyl hederagonate[2] and icterogenin[1], opened a new approach to our problem. Both these triterpenes possess a primary $\beta$-ketol grouping at ring *A* comparable to a 18-hydroxy-17-keto moiety at ring *D* of the $C_{19}$-steroid series. Since 19-hydroxy-$\Delta^4$-3-ketosteroids represent a vinyl analogue, 19-hydroxy-$\Delta^4$-pregnene-3,20-dione (19-hydroxy-progesterone)[3] and 19-hydroxy-3-oxo-$\Delta^4$-etienic acid[4] were tested under similar alkaline conditions; in these instances, as well as with compound VI, formaldehyde was also eliminated (Table I)[5]. Subsequently, compound VI was submitted to the alkaline treatment on a preparative scale (13·6 mg, 3·2 N in potassium hydroxide for 2·5 h). From the complex reaction mixture, an approximately equivalent quantity of the formaldehyde-dimedone compound (m.p. 188–189·5°) and the main steroidal alteration product VI*c* ($R_{lig}$ 1·65 cm/h)[6] were isolated in a 20% yield. After rechromatography and repeated crystallization from ether-pentane, 0·75 mg of slightly impure 19-nor-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione (VI*c*) were secured; m.p. 168–171°; $\tilde{\nu}_{min}^{solid}$ 1725 $cm^{-1}$ (pentacyclic C = O), 1670 and 1620 $cm^{-1}$ (C = O, conjugated); $\lambda_{max}^{MeOH}$ 240 m$\mu$ (log $\varepsilon$ 4·21).

A mixed melting point with authentic material[7] did not show a depression, and identity was substantiated by the infrared spectra. It was anticipated that formaldehyde elimination of 19-hydroxy-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione (VI) would lead to the same 19-nor-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione (VI*c*) as obtained by alkaline[8] or acid[7] rearrangement of 19-nor-$\Delta^{5(10)}$-androsten-17-$\beta$-ol-3-one and subsequent oxidation of the 17-hydroxyl group, since both reactions would proceed by way of a common carbanion at $C_{(10)}$ to the thermodynamically favored configuration. Compound VI was compared with 19-hydroxyprogesterone and corresponded well in the following tests: molecular rotatory contribution ($\Delta M_D$) of the 19-hydroxyl group (Table II), the rates of the formation of "blue formazan"[9], and the changes in the ultraviolet spectra when these compounds were exposed to alkaline ethanol[10]; (in all these measurements 19-hydroxy-3-oxo-$\Delta^4$-etienic acid behaved irregularly[1]).

According to reports by G. PINCUS, R. I. DORFMAN, F. ELMADJIAN, and E. ROSEMBERG of this Institute, compound VI was not found to be markedly active in the following bioassays: modified myotrophic assay on rats[2], androgenic assay on chicks[3], electrolyte excretion assay (ratio of K/Na) on rats[4], and antitraumatic shock assay on rats[5].

Naturally occurring substances with a steroid skeleton oxygenated in $C_{(19)}$ are certain plant cardiac glycosides and possibly toad poisons[6]. 19-Hydroxyprogesterone and 19-hydroxy-desoxycorticosterone, prepared from the cardiac aglycone strophanthidin, did not have pronounced progestational and mineralocorticoid properties, respectively[7], paralleling the result of the androgenic assay on compound VI. However, 19-nortestosterone, 19-norprogesterone, and 19-nordesoxycorticosterone exhibited the basic bioactivity of the same order of magnitude as their corresponding 19-methylated compounds and in addition appeared to have activities of a different nature[8].

*Table II.*–Rotatory Contribution for the Introduction of the 19-Hydroxyl Group in $\Delta^4$-3-Ketosteroids

| Parent compound | $M_D$[1] | $M_D$ for the 19-hydroxylated cpd[2] | $\Delta M_D$ |
|---|---|---|---|
| $\Delta^4$-Androstene-3,17-dione (MW 286·4) | +573 | +538 | − 35 |
| $\Delta^4$-Pregnene-3,20-dione (MW 314·4) | +632 | +612[3] | − 20 |
| $\Delta^4$-Pregnen-21-ol-3,20-dione (MW 330·4) | +647 | +624[3] | − 23 |
| 3-Oxo-$\Delta^4$-etienic acid (MW 316·4) | +497 | (+356[4]) | (−141) |
| Methyl-3-oxo-$\Delta^4$-etienate (MW 330·4) | +534 | (+385[4]) | (−149) |

[1] All rotations were determined in a ~ 1% chloroform solution (accuracy of $M_D$ values ± 7). [2] In chloroform solution. [3] G. W. BARBER and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *19*, 1758 (1954). [4] P. TH. HERZIG and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *17*, 713 (1952).

The removal of the angular methyl group at $C_{(19)}$ is also of interest when one considers aromatization of ring *A* or *B*. Such elimination is considerably facilitated by the introduction of oxygen into $C_{(19)}$, and chemically those reactions have already been realized[9]. However, the

[1] D. H. R. BARTON and P. DEMAYO, J. Chem. Soc. *1954*, 887. – We are grateful to Dr. DEREK H. R. BARTON for having brought to our attention the formaldehyde elimination reaction and for the specimens of the triterpenes employed in this study.

[2] W. A. JACOBS, J. Biol. Chem. *63*, 631 (1925).

[3] G. W. BARBER and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *19*, 1758 (1954).

[4] P. TH. HERZIG and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *17*, 713 (1952). – We are indebted to Dr. MAXIMILIAN EHRENSTEIN and his co-workers for the two specimens of 19-hydroxylated steroids.

[4] Other tested hydroxylated $\Delta^4$-3-ketosteroids and dehydroabietinol (this latter substance kindly furnished by Dr. ROBERT P. JACOBSEN) did not give, as expected, positive chromotropic acid reaction. Corticosteroids, however, produced under the same conditions an unspecific reddish color of relatively faint intensity.

[6] The same ratio of mobility as for II and VIc (1:0·75) was also observed for testosterone and 19-nortestosterone when chromatographed on Whatman no. 1 paper with propylene glycol saturated ligroin. It is further worthy to note that the retardation of the mobility of VI by the primary hydroxyl group at $C_{(19)}$ is of the same order of magnitude like that of an equatorial hydroxyl group (e.g. at $C_{(6\alpha)}$.

[7] A. L. WILDS and N. A. NELSON, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 5366 (1953). – 19-Nor-$\Delta^4$-androstene-3,17-dione (m.p. 171–173° [from methanol]),[$\alpha$] $^{22}_{D}$ + 146° ± 2° (chloroform), $\lambda_{max}^{MeOH}CH_3OH$ 240 m$\mu$ [log $\varepsilon$ 4·24]) was kindly supplied by Dr. MARCEL GUT.

[8] A. J. BIRCH, J. Chem. Soc. *367* (1950).

[9] A. S. MEYER and M. C. LINDBERG, Anal. Chem. (in press).

[10] A. S. MEYER, manuscript in preparation.

[1] These data would thus confirm that 19-hydroxyprogesterone and 19-hydroxydesoxycorticosterone, prepared by EHRENSTEIN and co-workers from strophanthidin, have the normal steroid configuration. (G. W. BARBER, M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *19*, 1758 [1954]).

[2] E. EISENBERG and G. S. GORDAN, J. Pharmacol. Exper. Therapy *99*, 38 (1950).

[3] R. I. DORFMAN, Endocr. *42*, 1 (1948).

[4] M. R. COOK, Jr. and F. ELMADJIAN, J. Amer. Pharm. Assoc. *42*, 329 (1953).

[5] V. SCHENKER, Endocr. *53*, 345 (1953).

[6] *Cf.* reviews by L. F. FIESER and M. FIESER, *Natural Products Related to Phenanthrene*, 3rd ed. (New York, 1949); H. HEUSSER, Progr. Chem. Organic Natural Products *7*, 87 (1950); T. REICHSTEIN, Angew. Chemie *63*, 412 (1951); A. STOLL, Exper. *10*, 282 (1954).

[7] G. W. BARBER and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *19*, 1758 (1954).

[8] W. W. TULLNER and R. HERTZ, Endocr. *52*, 359 (1953). – L. G. HERSHBERGER, E. G. SHIPLEY, and R. K. MEYER, Proc. Exptl. Biol. Med. *83*, 175 (1953). – A. SANDOVAL, L. MIRAMONTES, G. ROSENKRANZ, C. DJERASSI, and F. SONDHEIMER, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 4117 (1953). – Dr. R. I. DORFMAN informed me privately that 19-nortestosterone is a potent androgen when administered to chicks orally or by comb inunction.

[9] *Cf., inter al.*, M. EHRENSTEIN, A. R. JOHNSON, P. C. OLMSTED, V. I. VIVIAN, and M. A. WAGNER, J. Org. Chem. *15*, 264 (1950). – G. W. BARBER and M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. *19*, 363 (1954). – E. B. HERSHBERG, M. RUBIN, and E. SCHWENK, J. Org. Chem. *15*, 292 (1950).

physiological formation of estrone-type substances is still obscure. Nevertheless, the ability of mammalian tissue to introduce oxygen at $C_{(19)}$, described here, would tend to support the idea that removal of the angular group as a one-carbon fragment in the course of ring *A* aromatization is a possible pathway. Biochemical experiments to prove or disprove this hypothesis are now being initiated in our laboratory. In this connection it might also be recalled that estrone itself has been isolated from box adrenal extracts[1]. From structural considerations, the *in vitro* biohydroxylation of an angular methyl group, first demonstrated here, is unlikely to be preceded by dehydrogenation to an olefine since this would imply fission and re-formation of a C–C-linkage. The 11-$\beta$-hydroxylation of $\Delta^4$-pregnene-17-$\alpha$, 21-diol-3, 20-dione by a similar adrenal preparation does also not involve an olefinic intermediate with the subsequent addition of one mole of water; this has recently been shown by the use of deuterium oxide[2]. Whether these hydroxylations are effected as substitution reactions or a more complex oxidative sequence by way of either an ionic or a radical mechanism is still a matter of speculation.

The author is indebted for assistance in certain phases of the work to Marjorie C. Lindberg and Paul Skogstrom. The investigation was supported by a grant of G. D. Searle and Company, Chicago, Illinois.

A. S. Meyer

*Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, Mass., January 2, 1955.*

*Zusammenfassung*

Die Aufklärung der Struktur von 19-Oxy-$\Delta^4$-androsten-3,17-dion (VI), einer Substanz, isoliert nach Inkubation von $\Delta^4$-Androsten-3,17-dion und von Dehydroepiandrosteron mit einem Rinder-Nebennieren-Homogenat, ist beschrieben. Dies ist unseres Wissens die erste Beobachtung der Hydroxylierung *in vitro* einer angulären Methylgruppe eines Steroids. Mehrere Folgerungen sind erörtert.

[1] D. Beall, J. Endocr. *2*, 81 (1940).
[2] M. Hayano and R. I. Dorfman, J. Biol. Chem. *211*, 227 (1954).

## Sul comportamento della sostanza fondamentale in membrane connettivali di ratto albino durante il passaggio di una soluzione salina

È noto che la diffusione di una soluzione acquosa nel derma è influenzata dalla presenza in esso di mucopolisaccaridi e dal loro grado di polimerizzazione (Chain e Duthie[1], Duran-Reynals[2], Favilli[3]. In un suo recente lavoro, Day[4] ha provato che la velocità di passaggio di soluzione fisiologica attraverso membrane di connettivo sottocutaneo di topo albino aumenta grandemente sotto l'azione della jaluronidasi. Egli conclude pertanto che la sostanza interfibrillare può essere considerata come costituita da una microstruttura proteica, relativamente impermeabilizzata, in condizioni normali, da acido jaluronico.

La presente nota espone i risultati di ricerche eseguite per definire ulteriormente le particolarità del passaggio di una soluzione salina attraverso membrane connettivali, e per accertare se è possibile ottenere serie di valori relativamente omogenee, tali da permettere uno studio di eventuali modificazioni patologiche del connettivo anche sotto questo punto di vista e con questa tecnica, che presenta il vantaggio di poter essere seguita *in vitro*, al riparo da possibili interferenze di fattori estranei (regime del circolo locale, od altri).

La tecnica è quella proposta da Day[1]. Le membrane, prelevate dal fianco degli animali, erano fissate a mezzo di un anello elastico piuttosto alto ad un estremo di un tubo immerso in un beaker contenente NaCl 9 %° in $H_2O$ distillata e riempito della stessa soluzione fino ad una altezza di cm 4 sopra il livello del liquido nel beaker. Si cronometrava il tempo impiegato dal menisco della soluzione nel tubo a scendere fra due traguardi posti a mm 3 l'uno dall'altro; il volume della porzione di cilindro compresa fra questi due traguardi era pari a $mm^3$ 71,2. Si è curato di mantenere costante la temperatura, operando in termostato: generalmente sono state usate temperature tra 32° e 34°C.

Come anche Day riconosce, non è possibile ottenere serie di membrane di spessore omogeneo; sì che i tempi di passaggio della soluzione clorurosodica variano grandemente tra loro, anche quando si confrontino membrane provenienti dallo stesso animale. Si poteva tuttavia pensare, supponendo che nel normale sia contenuta entro limiti non troppo larghi la quantità di mucopolisaccaridi presenti, che fossero confrontabili i valori, ottenuti da vari individui, del rapporto tra tempo di passaggio della soluzione salina e tempo di passaggio della stessa soluzione addizionata di jaluronidasi (S/J). È stata usata in queste ricerche jaluronidasi liofilizzata da testicolo di toro (Kinetin, della casa Schering di Berlino), in quantità di 4 U.R.V. Schering per ml. In numerose prove eseguite i valori di tale rapporto, in ratti normali giovani di peso tra 30 e 125 g, hanno variato essenzialmente fra 6 e 18. Si è inoltre potuto osservare, usando successivamente membrane provenienti dallo stesso ratto, che, se i tempi di passaggio della soluzione clorurosodica (S) così come quelli della soluzione clorurosodica più jaluronidasi (J) possono singolarmente presi differire moltissimo da una membrana all'altra, i rapporti S/J sono generalmente simili; il che porta a supporre che la quota di mucopolisaccaridi nel connettivo sottocutaneo di uno stesso animale sia sensibilmente del medesimo ordine di grandezza per le regioni prese in esame (vedi tabella).

Valori, in secondi, dei tempi di deflusso di soluzione clorurosodica 0,9% e della stessa + jaluronidasi, e rapporti tra questi due valori per coppie di membrane connettivali provenienti dal medesimo animale

| Ratti e relativo peso | Tempo di deflusso della soluzione salina (S), in second | Tempo di deflusso della soluzione con enzima (J), in s | Rapporto S/J |
|---|---|---|---|
| 1) ♀ g 30 | 226 | 14,8 | 15 |
| | 1294 | 72 | 18 |
| 2) ♀ g 75 | 113 | 14 | 8,1 |
| | 217 | 31 | 7 |
| 3) ♀ g 83 | 668 | 40 | 16,7 |
| | 93 | 5,8 | 16 |
| 4) ♀ g 125 | 95 | 8 | 11,9 |
| | 66 | 4,4 | 15 |
| 5) ♂ g 110 | 95 | 14,6 | 6,5 |
| | 99 | 17 | 5,8 |
| 6) ♂ g 33 | 86,8 | 12,2 | 7,1 |
| | 54 | 9 | 6 |

[1] E. Chain e E. S. Duthie, Brit. J. exp. Path. *21*, 324 (1940).
[2] F. Duran-Reynals, Bact. Rev. *6*, 197 (1942).
[3] G. Favilli, *Fenomeni di diffusione nei tessuti nel loro aspetto fisiologico e patologico* (I.T.E.R. ed., Torino 1941).
[4] T. D. Day, J. Physiol. *117*, 1 (1952).

[1] T. D. Day, J. Physiol. *117*, 1 (1952).

Per le concentrazioni di fermento usate, largamente in eccesso rispetto al substrato, la diminuzione del tempo di deflusso dopo aggiunta di jaluronidasi raggiunge pressocchè immediatamente il suo valore massimo.

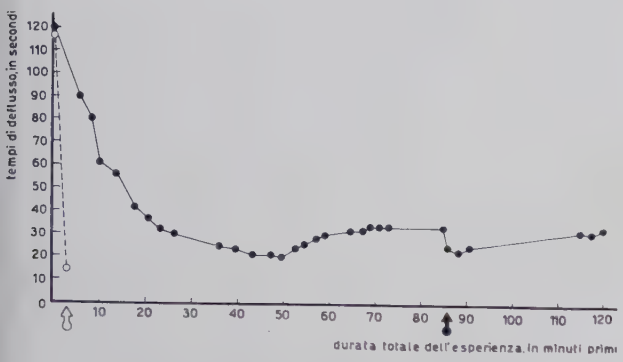



Figura 1. La linea tratteggiata con cerchi vuoti rappresenta una prova eseguita sottoponendo una membrana all'azione della jaluronidasi (freccia vuota su cerchio vuoto) dopo un solo passaggio del menisco tra i due traguardi. La linea continua con cerchi pieni rappresenta una prova eseguita facendo defluire a lungo attraverso una membrana soluzione clorurosodica; alla freccia piena su cerchio pieno fu aggiunta jaluronidasi.

Per avere indicazioni sulla natura del mucopolisaccaride, è stata usata in alcune prove jaluronidasi da veleno di *Bothrops jararaca* (1/500 in soluzione clorurosodica 9% °) che, come è noto (Reggianini[1]), a differenza di quella testicolare non è attiva sull'acido condroitinsolforico. La diminuzione del tempo di deflusso è stata anche in queste prove immediata e dello stesso ordine di grandezza; inoltre, aggiungendo dopo l'azione del veleno di Bothrops jaluronidasi testicolare, non si è avuto alcun ulteriore aumento della velocità di passaggio del liquido attraverso la membrana. La stessa cosa si è avverata facendo agire prima jaluronidasi testicolare e poi jaluronidasi da Bothrops.

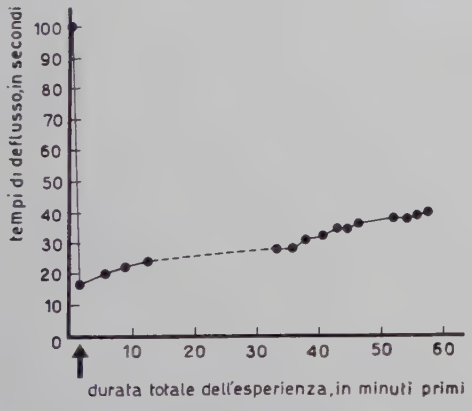



Figura 2. Aumento dei tempi di deflusso dopo il raggiungimento del tempo minimo. Alla freccia (secondo passaggio del menisco fra i due traguardi) fu aggiunta jaluronidasi. Dove la linea è tratteggiata il livello del liquido nel tubo fu lasciato cadere.

Si è d'altra parte osservato che, perfondendo la membrana in continuità con soluzione salina, il tempo di passaggio diminuisce progressivamente, fino al punto che la jaluronidasi sembra non esercitare più alcuna azione (v. fig. 1).

Si può quindi pensare che il mucopolisaccaride sia almeno in massima parte asportabile anche per una debole azione meccanica, oltre che di solubilizzazione, quale quella del liquido che fluisce dal tubo; sì che il fermento non può più agire per carenza del substrato. Inoltre in varie esperienze, eseguite sia con la sola perfusione della soluzione salina, sia con l'intervento dell'azione enzimatica, è stato notato che i tempi di passaggio, dopo aver raggiunto un valore minimo, tendevano lentamente ma progressivamente ad aumentare. Tale fenomeno, seppur non del tutto costantemente, si è presentato con notevole frequenza; l'aumento è stato sensibile, fino a raddoppiamento, in alcuni casi, del valore del tempo più breve nello spazio di poco meno di un'ora (v. fig. 2). In conclusione mi sembra di poter affermare che:

1. Nel connettivo sottocutaneo del ratto è contenuto un mucopolisaccaride, verosimilmente acido jaluronico, alla cui presenza è dovuta in gran parte la scarsa permeabilità della membrana alle soluzioni acquose. È possibile, tenendo presente che la quantità di tale sostanza probabilmente non è molta (Benassi e Prodi[1]) e che si tratta di materiale grandemente idratabile, che la sua funzione di ostacolo sia prevalentemente dovuta alla relativa immobilizzazione delle molecole di acqua nelle sue vicinanze.

2. Nel ratto giovane normale il rapporto tra tempo di passaggio di soluzione clorurosodica al 9% ° e tempo di passaggio della stessa soluzione addizionata di jaluronidasi oscilla, per il sottocutaneo del fianco e nelle condizioni dette, tra 6 e 18. Valori al di sotto o al di sopra di questi sono, se ottenuti nelle stesse condizioni, da ritenersi con ogni probabilità dovuti ad un contenuto anormale di acido jaluronico.

3. L'acido jaluronico, nella sostanza fondamentale di questo connettivo, è trattenuto da qualche altra struttura molecolare, ma non così saldamente da non essere gradatamente asportabile ad opera del semplice passaggio di liquido attraverso il tessuto; il che porta a pensare che il suo legame con una eventuale proteina sia molto labile.

4. L'aumento dei tempi di deflusso al di sopra del valore minimo raggiunto può far pensare che qualche substrato (proteina? altro mucopolisaccaride?) una volta asportato il mezzo impermeabilizzante costituito dall'acido jaluronico venga ad idratarsi a sua volta, restringendo in tal modo nuovamente gli interstizi lasciati liberi ed esercitando una più debole azione di rallentamento sulle molecole dell'acqua durante il loro tragitto attraverso la membrana.

Ho il piacere di ringraziare la Signorina Anna M. Garau, allieva interna dell'Istituto, per la valida collaborazione e la preziosa assistenza tecnica.

G. Benassi

*Istituto di Patologia Generale dell'Università di Bologna, il 28 luglio 1954.*

*Summary*

The author has studied some details of the passage of saline through connective membranes of normal albino young rats. A mucopolysaccharide is present in such membranes which can be removed soon after addition of hyaluronidase and, at a much slower rate, by the mere passage of fluids through the tissue. Such mucopolysaccharide, most likely hyaluronic acid, seems to be present in quantities not too different from one membrane to another and it appears to be bound to some other tissue microstructure by means of rather loose chemical bonds. Once the mucopolysaccharide removed, the hydration of some other substrate probably takes place, thus causing the free interstices to get narrower with consequent decrease in the flowing velocity of the saline.

[1] O. Reggianini, Boll. Ist. Sieroter. Milanese *29*, 456 (1950).

[1] G. Benassi e G. Prodi, Giorn. di Biochimica *2*, 424 (1953).

## Acridine Orange Action on the Biochemical Metabolism of the Leaf Tissues of the Tobacco Plant

The research work reported in this note was undertaken for the purpose of connecting it up with a series of investigations, not yet completed (Scarascia) on the possible mutagenic action of acridine compounds on *Nicotiana tabacum*.

In the $F_1$ of "17/51 strain" obtained from a plant of Bright (line No. 5) whose flower bud was submitted to a treatment with acridine orange, absorbed through an incomplete incision on the stem, close to some normal plants (*n*), cases were noted on whose leaves some anomalies peculiar to a virus disease became visible (plant *an*). These anomalies proved susceptible of transmission to other plants through inoculation. In spite of numerous genetic and cytogenetic controls, it has not yet been possible to determine if the anomalies observed were due to absorption of acridin orange solution by the tobacco plant, or to a common infection. It should, however, be remarked that in repeated cultures of $F_1$ of "17/51 strain", sown both under glass and in the open air (and in the latter case in soils of different structure and topographic exposure) during the winter and spring seasons, care always being taken to disinfect the seeds with a $1‰$ solution of silver nitrate, plants with symptoms of virus disease were noted in each case.

The leaf tissues of *an*-plants of "17/51 strain" were submitted to analysis in order to determine by manometric methods the activity of the polyphenol oxidase (using cathecol and ascorbic acid as the substratum, buffered at pH 5), catalase and carbonic anhydrase[1]. The leaves of *n*-plants of the "17/51 strain" and those of plants of line No. 5 were used for tests. The determination of enzyme activities has always been made on leaves placed between the 14th and 20th knots of plants at the flower stage, in order to obtain values comparable with one another, in view of the very great variability of the enzyme systems during the plant's physiological cycle.

The first groups of our experiments show the following results (Table I):

(*a*) catalase and carbonic anhydrase activities in leaf tissues of *an*-plants of "17/51 strain" gave values slightly below those of the test;

(*b*) polyphenol oxidase activity in *an*-plant leaves of "17/51 strain" was found to have doubled, and more than doubled, when compared to that obtained from the test plants. This result may probably represent one of the numerous effects of an irregularity that occured in the respiration of the tobacco plant.

Since recently Brachet[2] and Ephrussi[3], working respectively on fragments of Arbacia ova and on colonies of Saccharomyces, observed in those organisms a deterioration of the enzyme oxidizing system due to an acridine compound (trypaflavin), I deemed it advisable to make some experiments to demonstrate the effect of acridine orange acting *in vitro* and *in vivo* on polyphenol oxidase, catalase and carbonic anhydrase of tobacco leaf tissues.

For the test *in vitro*, the acridine orange was used on the homogenised leaf of a Bright (line No. 5) plant. The result was a slight inhibition of catalase and polyphenol oxidase activities, whereas the carbonic anhydrase was slightly increased (Table II, col. 1).

The test *in vivo* was made, allowing the leaves of alternate knots of several Bright (line No. 5) plants to absorb a $2‰$ solution of acridine orange through an incision made in the principal nervure at the base of the leaf stalk. The control test was made on leaves alternating on the same plant with those that had been treated. The result of the test *in vivo* is given in Table II, col. 2. We consider of special interest the results obtained for the polyphenol oxidase activity; they may be summed up as follows:

(1) after five days of treatment, the enzyme activity was found to be below normal;

(2) after eight days of treatment, it appeared to be approximately of the same degree as normal;

(3) after 20 and more days of treatment, the enzyme activity was more than double the normal.

The inhibiting action exercised by acridine orange on polyphenol oxidase activity, as observed after 5 days treatment, agrees with the results of the *in vitro* test; it may be assumed that as the acridine molecule has a structure similar to that of riboflavin, it takes the place of the latter, exercising an inhibiting action on tissue respiration[1].

It would also seem to us worthy of notice that after absorbing acridine orange solution, for 20 days the leaf tissues show a polyphenol oxidase activity which has doubled and more than doubled, when compared to the test trial. This is very interesting, more especially if we consider that these values agree with those obtained by analysis of the leaf tissues belonging to *an*-plants of "17/51 strain". In both cases, it would seem that the anomaly of the process of oxidation originates from the treatment with acridine orange, carried out in the case of the *in vivo* test on tobacco leaves, and, in the second case, probably on sex cells of the mother plant of the "17/51 strain", the $F_1$ of which presented many *an*-plants with symptoms of virus disease. It may be of interest to review this behaviour on the basis of the following considerations: the existence of stechiometric compounds demonstrated experimentally has been among acridines and the adenilyc acid and ATP[2], the two last being considered essential for the formation of energy-rich bonds containing phosphorous ($\sim$ ph); the stability of the $\sim$ ph bonds producing system is notable inferior to that of the oxidizing system[3], and many agents (and acridines are among them) that disturb the former system will cause the disjunction of the reactions of phosphorylation from those of oxidation, often with a subsequent stimulating effect on the oxidation reactions[4]. From the results referred to in this note, it would appear that acridine orange has a stimulating effect on the oxidations of the leaf tissues of the tobacco plant. Brachet also, as a conclusion to his researches on Arbacia ova[5], was of the opinion that both enucleation and acridine treatment would hinder the production by the nucleus of adenylic acid.

To conclude this note, we consider that we have very probably met in the case described with a deterioration of the protein synthesis process occurring in the plant cells; we may attribute this to the hyper-activity of the

[1] G. T. Scarascia et M. E. Venezian, Il Tabacco *649*, 272 (1953).
[2] J. Brachet, Arch. inter. Physiol. *60*, 187 (1951).
[3] B. Ephrussi, Pubbl. Staz. Zool. Napoli, suppl. v. 22 (1950).

[1] M. G. Sevag, Advances in Enzymology *6*, 114 (1946).
[2] Th. Wagner-Jauregg, Z. Physiol. Chem. *188*, 239 (1936). – D. Silvermann, Biochem. J. *31*, 423 (1937).
[3] Nathan O. Kaplan, Enzymes *2*, 78 (1953).
[4] Nathan O. Kaplan, Enzymes *2*, 92 (1953).
[5] J. Brachet, Ann. Soc. roy. Zool. Belg. *1950*, 81.

*Table I*

| Enzyme activity | Date of analysis | *n*-plants of "17/51 strain" | *an*-plants of "17/51 strain" | plants of line No. 5 |
|---|---|---|---|---|
| Catalase in $cm^3$ $O_2$ developed in 3′ at 25°C and pH = 8 . . . . . | 25–7–′52 | 13·75 | 10·35 | |
| | 4–8–′52 | 14·50 | 14·00 | |
| | 12–8–′52 | 12·60 | 9·50 | |
| Carbonic anhydrase in $mm^3$ $CO_2$ developed in 2′ at 15°C and pH = 6·8 | 17–7–′52 | 550 | 380 | |
| | 12–8–′52 | 660 | 600 | |
| Polyphenol oxidase in $mm^3$ $O_2$ absorbed in 10′ at 25°C and pH = 5 . | 4–8–′52 | 1800 | 2400 | |
| | 11–8–′52 | 880 | 1850 | |
| | 12–8–′52 | 1070 | 2030 | 1030 |
| | 3–8–′53 | | 1550 | 450 |

*Table II*

| Enzyme activity | *in vitro* treatment | | *in vivo* treatment | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | essay | blank | after 5 days | test | after 8 days | test | after 20 days | test | after 30 days | test |
| Catalase in $cm^3$ $O_2$ developed in 2′ at 25°C and pH = 8 . . . . . | 15·5 | 22·5 | 23·2 | 25 | 14·2 | 15·2 | | | | |
| Carbonic anhydrase in $mm^3$ $CO_2$ developed in 2′ at 15°C and pH = 6·8 . . . . . | 470 | 300 | 610 | 410 | 510 | 470 | | | | |
| Polyphenol oxidase in $mm^3$ $O_2$ absorbed in 10′ at 25°C and pH = 5 . . . . . | 360 | 460 | 900 | 1000 | 1290 | 1150 | 1250 | 400 | 1000 | 550 |

polyphenol oxidase and to successive accumulation of hydrogen peroxide due to an insufficient catalase activity[1], or to some disorder occurring in the system that produces the energy employed in the processes of synthesis themselves.

M. E. Scarascia Venezian

*Istituto di Frutticoltura e di Elettrogenetica, Roma, July 12, 1954.*

*Zusammenfassung*

Blätter von Tabakpflanzen wurden *in vivo* und *in vitro* mit 20‰ Acridinorange-Lösung behandelt und danach die Aktivitäten von Katalase, Polyphenoloxydase und Kohlensäureanhydrase bestimmt. Nach zwanzigtägiger *In-vivo*-Behandlung machte sich eine Störung der Oxydationsprozesse bemerkbar. Ähnliche Befunde ergaben sich bei Pflanzen, welche das Bild einer Viruskrankheit zeigten und von einer Mutterpflanze stammten, deren Blütenknospen mit 2‰ Acridinorange-Lösung behandelt worden waren.

[1] K. Yamafuji, Enzymologia *15*, 223 (1952).

## Preliminary Studies on the Metabolism of Vacuolated Cells Following Hypoxia

Researches on the metabolism of vacuolated cells are still in progress in this laboratory. The present paper is an account of exploratory experiments.

Some difficulties have been encountered in producing experimentally a satisfactory and well-reproducible cell vacuolation in rat tissues. The use of substances which directly interfere with some enzymatic systems has been intentionally avoided, owing to the difficulty of discerning the changes due to the direct action of the drug from those connected with cell vacuolation. The ureter ligation, succesfully used by Vernoni[1] on rabbits, induced in the rat kidney a mild vacuolation and a marked necrosis. On the other hand, a slight steatosis took place in the liver together with vacuolation after partial hepatectomy according to the technique of Price and Lard[2]. At least for our purposes, the most satisfactory liver cell vacuolation was obtained by exposing the rats to hypoxia. Soda lime (Trowell[3]) or decompression (Pichotka[4]) did not permit a well-adjustable degree of hypoxia, as shown by the necrotic areas that complicated the cytological picture. In our study, the liver cell vacuolation was induced by keeping the rats in a continuously renewed atmosphere of nitrogen (97 %) and oxygen (3 %) for 2 h, according to Pichotka's technique[4]. It should be noted that even with this method the cell vacuolation did not appear uniform nor very typical. Apart from a number of plain vacuolated cells, many other elements were present showing a particular appearance. These cells presented well-defined limits; their cytoplasm consisted of hyperchromic areas alternated by small and pale zones irregularly bordered. All the cells did not differ in size from the normal ones. The meaning of this cellular appearance is at present under study, but presumably the change represents an early stage of cell damage preceding the formation of true vacuoles.

[1] G. Vernoni, Bios *1*, 77 (1913).
[2] G. M. Price and A. K. Lard, Cancer Res. *10*, 650 (1950).
[3] O. A. Trowell, J. Physiol. *105*, 268 (1946).
[4] J. Pichotka, Beitr. path. Anat. *107*, 117 (1942).

*Table I.*–Oxydative metabolism and total water content of rat liver slices*.

Atm.: air
Temp.: 37° C.

Medium: NaCl . . . . . 135 × $10^{-3}M$
KCl . . . . . 27 × $10^{-4}M$
$CaCl_2$ . . . . . 19 × $10^{-4}M$
Phosphate buffer (pH 7·4) . . . . . 96 × $10^{-3}M$
Octanoic or succinic acid (Na-salts) . . . 5 × $10^{-3}M$

| | Controls | Hypoxic animals | $t$ | P |
|---|---|---|---|---|
| $Q_{O_2}$ | 5·70 ± 0·20 | 6·00 ± 0·35 | 0·60 | 0·6 > P > 0·5 |
| $Q_{O_2}$ octanoic | 7·90 ± 0·33 | 7·97 ± 0·55 | 0·11 | P > 0·9 |
| $Q_{O_2}$ succinic | 19·90 ± 0·98 | 21·20 ± 0·57 | 1·19 | 0·3 > P > 0·2 |
| RQ | 1·01 ± 0·05 | 0·65 ± 0·04 | 5·39 | P < 0·01 |
| Total water content (mg/g wet tissue) | 711 ± 3·7 | 711 ± 3·8 | – | – |

* Each value represents the mean of 10 animals ± s.e.

Adult albino rats were used throughout our experiments. Both normal and hypoxic animals were fasted for 16–20 h, after which they were killed by decapitation. Since an appreciable vacuolation after hypoxia was present only in the liver, our metabolic researches have been limited exclusively to this organ. Oxygen-uptake, octanoic-oxidase and succinic-oxidase activities were measured on liver slices according to the direct Warburg method[1]. Respiratory quotient was determined according to the Dixon modification[2] of Dickens' and Sȳmer's first method[3]. The total water content was calculated by the difference between the wet weight and the dry weight of the tissue. The results obtained are summarized in Table I. The data on the water content appear of some interest. Since no modification has been observed in vacuolated cells, it is reasonable to assume that vacuolar degeneration is not necessarily always a hydropic degeneration. From the examination of the data in Table I, it appears also evident that the RQ is significantly lowered in vacuolated cells as compared with the controls. On the contrary, oxygen-uptake, octanoic-oxidase and succinic-oxidase activities remain unchanged. At present a satisfactory explanation of the lowering of the RQ is impossible, since the change may be the consequence of several metabolic deviations, all of which are possible.

In addition to the above experiments, acid-soluble phosphorus fractionation has been carried out in normal and vacuolated tissues. Livers were removed from both normal and hypoxic rats under $MgSO_4$ anaesthesia according to Dubois *et al.*[1]. Phosphorus fractionation was performed after Pinchot and Bloom[2], using the method of Fiske and Subbarow[3] for the phosphorus determination in the samples. The data given in Table II show clearly that labile P(ATP, ADP) and total high energy phosphate bonds (~P) are decreased in vacuolated tissues. Since this diminution was also found in hypoxic rats brought to the normal $O_2$ tension 15 min before decapitation, the ~P reduction cannot be due to the lowered $O_2$ tension. Therefore it seems logical to conclude that the biochemical change is in relation to the cytological alterations.

This work has been supported by research grants from the «Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori».

Maria Bassi and A. Bernelli-Zazzera

*Institute of General Pathology, University of Milan, Italy, October 1, 1954.*

*Riassunto*

È stato studiato il metabolismo ossidativo di fette di fegato di ratto in degenerazione vacuolare da ipossia. Si è rilevata una diminuzione del quoziente respiratorio, mentre il consumo globale di ossigeno, senza substrati o in presenza di ottanoato o di succinato, rimane invariato. Nei fegati degli animali tenuti in ipossia si ha diminuzione del P labile (ATP, ADP) e dei ~P totali.

[1] O. Warburg, in R. Deotto, *I metodi manometrici in biologia* (L. Cappell, Bologna, 1942).
[2] M. Dixon, *Manometric Methods* (University Press, Cambridge 1934).
[3] F. Dickens and F. Sȳmer, Biochem. J. *24*, 905 (1930).

[1] K. P. Dubois, H. G. Albaum, and V. R. Potter, J. Biol. Chem. *147*, 699 (1943).
[2] G. B. Pinchot and W. L. Bloom, J. Biol. Chem. *184*, 9 (1950).
[3] C. H. Fiske and Y. Subbarow, in B. Lange, *Kolorimetrische Analyse* (Verlag Chemie, G.m.B.H., Berlin, 1941).

*Table II.*–Acid-soluble phosphorus fractions of livers from controls and hypoxic rats (mg P/100 g wet tissue)[1]

| | Controls | Hypoxic animals | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | treatment *a* | $t$ | P | treatment *b* | $t$ | P |
| 180 min P | 54·5 ± 3·42 | 47·9 ± 2·30 | 1·68 | 0·2 > P > 0·1 | 51·6 ± 2·64 | 0·63 | 0·6 > P > 0·5 |
| Inorg. P | 26·9 ± 0·90 | 28·7 ± 1·60 | 0·48 | 0·7 > P > 0·6 | 28·8 ± 1·55 | 0·82 | 0·5 > P > 0·4 |
| Ester P | 14·2 ± 1·79 | 11·5 ± 0·96 | 1·33 | 0·3 > P > 0·2 | 14·6 ± 2·09 | 0·16 | 0·9 > P > 0·8 |
| Labile P (ATP, ADP) | 10·5 ± 0·40 | 5·0 ± 1·69 | 3·14 | 0·02 > P > 0·01 | 4·4 ± 1·20 | 4·77 | P < 0·01 |
| Phosphocreatine P | 2·9 ± 1·10 | 2·7 ± 0·76 | 0·18 | 0·9 > P > 0·8 | 3·8 ± 0·39 | 0·79 | 0·5 > P > 0·4 |
| ~P | 13·4 ± 1·39 | 7·7 ± 1·91 | 2·41 | 0·05 > P > 0·02 | 8·2 ± 1·17 | 2·85 | 0·05 > P > 0·02 |

[1] Each value represents the mean of 5 animals ± s.e. Treatment *a*: animals killed immediately after 2 h hypoxia. Treatment *b*: animals brought to normal $O_2$ tension 15 min before sacrifice.

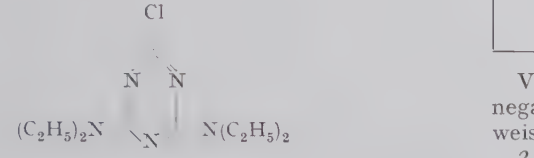
## Über Pflanzenwachstumsregulatoren

*Chlorazin, eine phytotoxisch wirksame Substanz*

In der Herbizidliteratur haben bisher einige Vertreter vom Typus der Phenoxyfettsäuren, wie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure[1] (2,4-D) oder 2-Methyl-4-chlorphenoxy-essigsäure[2] (MCP), der aromatischen Urethane, wie Phenyl-isopropyl-carbamat[3] (IPC) oder 3-Chlorphenyl-isopropyl-carbamat[4] (CIPC), und araliphatische Harnstoffe, wie 4-Chlorphenyl-dimethyl-harnstoff[5] (CMU, DuPont), besonderes Interesse gefunden.

2-Chlor-4,6-bis-(diäthylamino)-s-triazin[6] (G 25804; allgemeiner Name: Chlorazin) hat, wie den unten angegebenen Versuchsresultaten zu entnehmen ist, ebenfalls einen starken Einfluss auf bestimmte physiologische Vorgänge in der Pflanze.

Die Substanz der Formel



wurde kürzlich im Rahmen von pharmakodynamischen und chemotherapeutischen Arbeiten von amerikanischen Autoren erstmals beschrieben[7]. Wir haben für diesen Körper folgende physikalische und chemische Charakteristika gefunden:

$Kp_{0,05\ mm}$ 104–106° $F = 27°$
$d_{20°} = 1{,}0956$ $n_{D20} = 1{,}5320$

Bei Zimmertemperatur ist G 25804 sowohl gegen wässerige Alkalien wie auch gegen verdünnte Säuren beständig. Bei erhöhter Temperatur lässt sich mit mässig konzentrierter Säure das Halogenatom gegen eine Hydroxylgruppe austauschen.

Die Löslichkeit von G 25804 in Wasser ist sehr gering (0,0009% bei 22°), währenddem sich die Substanz in Kohlenwasserstoffen, chlorierten Kohlenwasserstoffen, niedrig molekularen Alkoholen und Ketonen leicht löst.

Chlorazin verfügt praktisch über keine fungizide und eine sehr geringe insektizide Wirkung. Die LD50 an Mäusen bzw. Ratten *per os* betragen 2,0 g/kg bzw. 1,75 g/kg. Die phytotoxischen Eigenschaften von G 25804 lassen sich durch folgende Versuchsanordnungen im Vergleich mit einigen bisher verwendeten Herbiziden erläutern.

1. *Phytohormontest.* Testpflanze Buschbohnen (*Phaseolus vulgaris* L., Sorte «Sensation»). Methode: Junge Bohnenpflanzen werden waagrecht gelegt. An der Unterseite des 3–4 cm langen Epikotyls wird ein Tropfen einer Lösung der zu prüfenden Substanz angesetzt (2000 ppm in Olivenöl). Aus der eventuellen Störung der einsetzenden negativ geotropischen Reaktion wird geschlossen, ob die Prüfsubstanz Wuchsstoffcharakter hat oder nicht. Die Wirkung wird nach folgendem Indexschema ausgedrückt: 10 = normale negativ geotropische Reaktion, 5 = Epikotyl wächst waagrecht weiter, 0 = Epikotyl wächst senkrecht abwärts.

*Tabelle I*

| Produkt | Reaktion nach Tagen | | |
|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 4 |
| 2,4-D | 0 | 0 | 0 |
| CIPC | 10 | 10 | 10 |
| CMU | 9 | 10 | 10 |
| G 25804 | 10 | 10 | 10 |
| unbehandelt | 10 | 10 | 10 |

Von den untersuchten Produkten stört nur 2,4-D die negativ geotropische Reaktion. Die anderen Produkte weisen offenbar keinen Wuchsstoffcharakter auf.

2. *Beeinflussung der Keimung und des Wachstums.* Methode: Eine Erdmischung, der pro Liter 100 mg der Prüfsubstanz beigemengt worden sind, wird mit verschiedenen Testpflanzen besät. Hernach wird die Keimung (Tabelle II) und das weitere Wachstum der Sämlinge (Tabelle III) beobachtet.

In Tabelle II wird der Einfluss verschiedener Herbizide auf die Keimung einiger Testpflanzen dargestellt.

*Tabelle II.* Indexziffer: 10 = normale Keimung, 0 = keine Keimung, 9–1 = Zwischenstufen

| Produkt | Testpflanzen | | |
|---|---|---|---|
| | Hafer (*Avena sativa* L.) | Senf (*Sinapis alba* L.) | Gurken (*Cucumis sativus* L.) |
| 2,4-D | 10 | 1 | 5 |
| CIPC | 0 | 10 | 7 |
| CMU | 10 | 10 | 12* |
| G 25804 | 10 | 10 | 12* |
| unbehandelt | 10 | 10 | 10 |

* Erhöhter Keimungsprozentsatz.

G 25804 und CMU beeinflussen die Keimung der Versuchspflanzen nicht und verhalten sich deutlich verschieden von 2,4-D und CIPC.

Die Wirkung der genannten Herbizide auf das Wachstum der Testpflanzen ist aus Tabelle III zu ersehen.

*Tabelle III.* Indexziffer: 10 = normales Wachstum, 0 = kein Wachstum, 1–9 = Zwischenstufen

| Produkt | Testpflanzen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Hafer (*Avena sativa* L.) | | Senf (*Sinapis alba* L.) | | Gurken (*Cucumis sativus* L.) | |
| | Beobachtungen nach Tagen | | | | | |
| | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 |
| 2,4-D | 5 | 7 | 0 | 1[d] | 0 | 1[d] |
| CIPC | 0 | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| CMU | 10[a] | 0[b] | 3[a] | 0[b] | 4[a] | 0[b] |
| G 25804 | 10[a] | 6[a,c] | 3[a] | 0[b] | 7[a] | 1[a,c] |
| unbehandelt | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

[a] chlorotisch, [b] abgestorben, [c] am 30. Versuchstag abgestorben, [d] verzögerte Keimung.

[1] P. W. Zimmerman und A. E. Hitchcock, Contr. Boyce-Thompson Inst. *12*, 321 (1942). – L. W. Kephart und L. S. Evans, Bull. Plant Industry Station, Beltsville, 97CC (1948).

[2] R. E. Slade, W. G. Templeman und W. A. Sexton, Nature *155*, 497 (1945). – M. A. H. Tincker, J. Roy. Hort. Soc. *71*, 141 (1946).

[3] W. G. Templeman und W. A. Sexton, Nature *156*, 630 (1945). – J. R. W. Wilson, Agr. Chem. *6*, (2), 34 (1951).

[4] E. D. Witman und W. F. Newton, Proc. 5th Annual Meeting Northeastern WCC, 45 (1951). – E. D. Witman, Agr. Chem. *8* (10), 50 (1953).

[5] H. C. Bucha und C. W. Todd, Science *114*, 493 (1951). – G. L. Mc Call, Agr. Chem. *7* (5), 40 (1952).

[1–5] stellen Beispiele der sehr umfangreichen Literatur über diese Verbindungen dar.

[6] Verwendung zum Patent angemeldet.

[7] W. M. Pearlman und C. K. Banks, Amer. Soc. *70*, 3728 (1948). – J. T. Thurston, J. R. Dudley, D. W. Kaiser, I. Hechenbleikner, F. C. Schaefer und D. Holm-Hansen, Amer. Soc. *73*, 2981 (1951).

Auch in dieser Versuchsanordnung verhält sich Chlorazin ähnlich wie CMU und deutlich verschieden von 2,4-D und CIPC.

Gestützt auf die Laboratoriums- und Gewächshausversuchsresultate wurde G 25804 zu einer praktischen Prüfung als Pre-emergence-[1] und Kontaktherbizid vorgeschlagen und 1954 in orientierenden Freilandversuchen in der Schweiz und in Amerika geprüft. Über seine Untersuchungen hat H. M. Day am Meeting der Southern Weed Control Conference[2] am 17. Januar 1955 vorgetragen.

Diese Versuche haben bestätigt, dass Chlorazin, in geeigneten Konzentrationen angewandt, insbesondere in Baumwoll- und Bohnenkulturen eine gute Wirksamkeit u.a. gegenüber Raygras (*Lolium perenne* L.), Hühnerdarm (*Stellaria media* Vill.), Bluthirse (*Digitaria sanguinalis* Scop.) und Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.) hat, ohne die Nutzpflanzen wesentlich zu beeinflussen. Über weitere Untersuchungen mit Chlorazin soll später berichtet werden.

A. Gast, E. Knüsli und H. Gysin

*Aus den Forschungslaboratorien der J. R. Geigy AG., Basel, den 13. Dezember 1954.*

*Summary*

It has been demonstrated that 2-chloro-4,6-bis-(diethylamino)-s-triazine (G 25 804, common name: Chlorazin) shows remarkable phytotoxic reactions. The possible use of Chlorazin as a pre- and post-emergence herbicide is discussed.

[1] Als Pre-emergence-Herbizide werden in der angelsächsischen Literatur Unkrautmittel bezeichnet, welche vor der Keimung der Kulturpflanzen auf die Oberfläche des besäten Feldes appliziert werden. Besonderes Interesse bieten dabei Mittel, welche selektiv wirken, das heisst die keimende Unkrautflora vernichten, ohne die Kulturpflanzen zu schädigen.

[2] J. Antognini und H. M. Day, *Exp. Comp. 444* (entspricht G 25804 = Chlorazin) *a Pre- and Post-emergence Herbicide.*

---

## Einfluss von Streptomycin und von Tetracyclinen auf die Entwicklung keimender Samen

Lässt man die Samen von Getreidearten, zum Beispiel Gerste, nach Behandlung mit Lösungen von Streptomycin geeigneter Konzentration zwischen Filtrierpapier und dann am Tageslicht keimen, so bleiben die Keimblätter, auch im Licht, farblos, ihr Katalasegehalt ist stark vermindert, und es besteht anscheinend eine gewisse Analogie der so gebleichten Pflanzen mit den chlorophylldefekten Mutanten, welche zum Beispiel bei Albina von Gerste spontan oder in höherem Grad nach Röntgenbestrahlung auftreten[1].

Die Wurzeln der durch Streptomycin behandelten Samen sind anomal kurz und zeigen deutlich Klauenform, die aber nicht für die Streptomycinwirkung spezifisch ist.

An der Flagellate *Euglena gracilis* wurde dieser Chlorophylleffekt des Streptomycins von Provasoli, Hutner und Schatz[1] bestätigt und von Hutner und seiner Schule[2] durch genetisch bemerkenswerte Versuche an Flagellaten erweitert. Weitere diesbezügliche Versuche verdankt man besonders Schopfer[3] und Rosen[4]. Ebenfalls Hemmungen der Chlorophyllbildung durch Streptomycin beobachteten Bogorad[5] an Fichtensamen, Wright[6] an Weizen und Rettichsamen und Dubé (1952) an *Chlorella*[7].

Die erwähnte Hemmung der Chlorophyllbildung konnten wir ausser durch Streptomycin auch durch Dihydro-streptomycin hervorrufen; mit anderen Stoffen konnte bisher ein solcher Effekt nicht erzeugt werden.

Da wir hofften, die chemischen Vorgänge, die bei den chlorophylldefekten Gerstenmutanten vom Albinatypus auftreten, durch das Studium von chemisch induzierten Analogiefällen aufklären zu können, haben wir systematisch Stoffe gesucht, die – ähnlich wie Streptomycin – Chlorophyllbildung in keimenden Samen beeinflussen. Strukturanalogien scheinen hierbei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, jedenfalls sind keine solchen erkannt worden. Wir haben deshalb Stoffe zum Vergleich herangezogen, welche, wie Streptomycin, in *Actinomyceten* vorkommen. Zu diesen Stoffen, den Actinomycinen, gehören – ausser dem zuerst von Waksman und Woodruff[8] isolierten Actinomycin A und dem von Brockmann[9] mit Erfolg bearbeiteten Actinomycin C – auch die *Tetracycline*, die wegen ihrer hohen Aktivität und ihres breiten Wirkungsbereiches (wir vermeiden den ungeeigneten Ausdruck «Wirkungsspektrum») bereits eine weitgehende medizinische Anwendung gefunden haben.

Chlortetracyclin (Aureomycin), Tetracyclin (Akromycin) und Oxytetracyclin (Terramycin,) deren Konstitutionsformeln hier als bekannt vorausgesetzt werden dürfen, sind in bezug auf ihre antibakterielle Wirkung *in vitro*[10] und *in vivo*[11] (an mit verschiedenen Bakterien infizierten Mäusen) und im übrigen pharmakologisch[12] in *Lederle Laboratories Division* sehr eingehend geprüft worden und haben sich als einander sehr ähnlich erwiesen, wenn auch gewisse Unterschiede festgestellt werden konnten.

*Keimungsversuch mit Tetracyclinen.* Zur Verwendung kamen die Samen[13] von Gerste (*Hordeum distichum*), Weizen (*Triticum vulg.*, Bancovete) und Hafer (*Avena sativa*, Bancohavre II), von denen wir je 50 Körner der Einwirkung von 5 bis 25 mg Antibiotikum unterwarfen, in der gleichen Weise wie früher Streptomycin. Einige

[1] B. v. Euler, Kem. Arb. [NF. II] *9*, 1 (1947). – M. Bracco und H. v. Euler, Kem. Arb. [NF. II] *10*, I und II (1947). – H. v. Euler, Ark. Kemi, Min. Geol. [A] *26*, Nr. 6 (1948); Ark. Kemi *1*, Nr. 31 (1949). – H. v. Euler und L. Heller, Ark. Kemi *1*, Nr. 31 (1949); C. r. Acad. Sci. *227*, 16 (1948). – Siehe auch: F. Cedrangolo, Acta Pont. Acad. Sci. *14*, Nr. 7 (1951).

[1] L. Provasoli, S. H. Hutner und A. Schatz, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *69*, 279 (1951).

[2] L. Provasoli, S. H. Hutner und I. J. Pintner, Cold Sprung Harbor Symp. quant. Biol. *16*, 113 (1951).

[3] W. H. Schopfer und Mitarbeiter, Arch. Sci. *5*, 9 (1952); Soc. Helv. Sci. nat. *1936*, 320. – Bull. Soc. chim. Biol. *36*, 1195 (1954).

[4] W. Rosen, Ohio J. Sci. *54*, 73 (1954); Soc. exp. Biol. Med. *85*, 385 (1954).

[5] I. Bogorad, Amer. J. Bot. *37*, 676 (1950).

[6] J. M. Wright, Ann. Bot. *15*, 493 (1951).

[7] R. Giuliano, M. L. Stein und H. v. Euler, Ark. Kemi *6*, Nr. 53 (1954).

[8] S. A. Waksman and H. B. Woodruff, J. Bact. *40*, 585 (1940).

[9] H. Brockmann und Mitarbeiter, Naturwissenschaften *36*, 376 (1949). – Siehe auch Actinomycin X in Naturwissenschaften *40*, 225 (1953). – Chr. Hackmann, Z. Krebsf. *58*, 607 (1952); Strahlenther. *1953*, 296.

[10] N. Bohonos *et al.* Antibiotics Ann. 1953–1954, 49.

[11] J. S. Kiser *et al.* Antibiotics Ann. 1953–1954, 57.

[12] R. W. Cunningham *et al.* Antibiotics Ann. 1953–1954, 63.

[13] Wir danken Herrn Direktor Dr. H. Lamprecht, Weibullsholm, für das sehr keimkräftige Samenmaterial, Herrn Professor Dr. Å. Åkerman, Svalöv, für die freundliche Überlassung von Gerstenmutanten vom Albinatypus.

Actinomycine haben sich beim Keimungstest als toxisch erwiesen. Es muss gleich betont werden, dass die mit Gerste, Weizen und Hafer erhaltenen Resultate erhebliche Unterschiede[1] bezüglich des Einflusses der Antibiotikummengen und der Azidität (pH) gezeigt haben.

Reine Präparate der untersuchten Antibiotika bzw. ihrer Hydrochloride verdanken wir der *American Cyanamid Comp., Lederle Laboratories Division, Pearl River.*

Bei unseren hier kurz mitzuteilenden Versuchen hat es sich zunächst um einen Vergleich gehandelt zwischen unseren chemisch induzierten, den mittels Röntgenstrahlen[2] induzierten und den in Albinamutanten der Gerste spontan auftretenden Chlorophylldefekten.

Bezüglich der Methodik verweisen wir auf die früheren Arbeiten dieses Institutes; die Behandlung der Samen geschah teils direkt in den Lösungen des Antibiotikums, teils nach sechsstündigem Quellen in Wasser. Wenn die Keimlinge eine Länge von 1 bis 3 mm erreicht hatten, wurden die Samen zwischen Filtrierpapier in Schalen ausgebreitet und nach etwa 3 Tagen dem freien Tageslicht ausgesetzt. Stets Parallelversuche mit reiner Wasserkeimung. Azidität der Lösungen stets pH 5,5–5,8.

*Aureomycin.* Die Keimung sowohl der Gersten- wie der Weizensamen war schon in den verdünntesten Aureomycinlösungen gegenüber den Parallelversuchen in Wasser 3 Tage verzögert, aber fast alle Samen (96%) keimten. Bei der Konzentration 10 mg Aureomycin per 100 ml Lösung wurden nach 6 Tagen die Keimlinge sichtbar. Besonders stark gehemmt war durchweg die Bildung der Wurzeln, die nie länger als 5 mm wurden (normale Länge in dieser Zeit 70 mm). Innerhalb von 15 Tagen erreichten die Keimlinge nach Quellung in Lösungen von 5 mg% Aureomycin die mittlere Länge von 40 mm; die Keimblätter ragten dann etwa 4–6 mm aus den Coleoptilen heraus. Sie waren nach zwölftägigem Stehen in hellem Tageslicht noch – je nach der Konzentration des Aureomycins – rein weiss oder ganz hellgrün, und der schwache Chlorophyllgehalt nahm auch nach weiteren 10 Tagen nicht mehr zu. Bei den Kontrollwasser-Versuchen betrug die mittlere Länge der Keimblätter in 15 Tagen 160 mm.

*Achromycin (Tetracyclin).* Verwendet zur Quellung wie Aureomycin in Lösungen von 2 bis 40 mg je 100 ml. Von den kleinsten Konzentrationen an vollständige (96%ige), aber sehr verzögerte Keimung, die in 20 Tagen bis zu einer Länge der Keimblätter von etwa 20 mm fortsetzt, Wurzeln immer klauenförmig und höchstens 10 mm lang.

Wenn nach 7–12 Tagen die Keimblätter aus den stets weissen Coleoptilen hervortreten und dann dem Tageslicht ausgesetzt sind, tritt bei Gerste, Weizen und Hafer eine *schwache* Ergrünung ein. Die Katalasewirkung dieser Blatteile beträgt dann im Mittel 40% der Katalasewirkung der grünen Blätter. Beim Hafer macht sich ein *Maximum* des Chlorophyldefektes mit der Achromycin-Konzentration deutlicher bemerkbar als bei Gerste und Weizen. Das Maximum tritt bei etwa 5 mg Achromycin je 100 ml ein. Bei dieser Konzentration bleiben die Keimblätter viel bleicher als die normalen. Besonders empfindlich gegen die Einwirkung von Aureomycin und Achromycin sind die Samen der Gerstenmutanten (Albinatypus). Sie entwickeln nur minimale Wurzeln und (durch 5 mg Achromycin) Keimblätter, die nie länger sind als 11 mm.

*Terramycin (Tetracyclin)* übt im wesentlichen den gleichen Einfluss auf die Samenkeimung aus wie Achromycin. Bei der Konzentration 10 mg je 100 ml bleibt etwa $^1/_5$ der 18 mm langen Keimlinge ganz weiss, die übrigen Keimblätter sind schwach grünlich.

Nach den Tetracyclinen wurden noch zwei weitere Actinomycine untersucht. *Neomycin A*[1] wurde aus dem Neomycin-Sulfat A (Lederle) durch Baryt freigemacht; es steht mit der Formel $C_{12}H_{26}N_4O_6$ dem Streptomycin strukturell nahe[2]. Nach Quellung in Lösung von 10 mg je 100 ml entwickelten sich die Samen von Gerste und Weizen gut, was der geringen Toxizität des Neomycins entspricht. Nach 8 Tagen erreichten die Keimlinge fast die gleiche Länge wie in den Parallelversuchen mit Wasser; sie waren normal grün, obwohl die Wurzeln nur 4–7 mm lang (normale Länge 50–60 mm) und klauenförmig waren.

*Fällung der Hefenukleinsäure durch Neomycin.* Streptomycin und Dihydrostreptomycin haben die Fähigkeit, Nukleinsäuren und Nukleoproteide zu fällen; diese Wirkungen sind früher von uns in Gemeinschaft mit Giuliano[3] gemessen worden. Zum Vergleich seien hier die folgenden Zahlen für Neomycin angegeben:

| Konzentration der Nukleinsäure | Molarität des Neomycins | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1600 | 1/3200 |
| 0,1 % | + + + + | + + | – | – – | – – |
| 0,05 % | + + + + | + + + + | + + + | + | – – |
| 0,025 % | + + + | + + + + | + + + + | + + | – |
| 0,0125% | + + | + + + | + + + | + + + | – |

Die fällende Wirkung des Neomycins zeigt sich noch grösser als die früher (l.c.) bestimmte Wirkung des Dihydrostreptomycins.

Durch die Gegenwart von Salzen von höherer Molarität als 0,02 wird diese Fällungswirkung stark erniedrigt. Über den Einfluss des Cysteins auf die Nukleoproteidfällung durch Neomycin wird an anderer Stelle berichtet. Ziéglé[4] fand die antibiotische (bakterizide) Wirkung des Neomycins auf einen Stamm von *Klebsiella pneumoniae* höher als diejenige des Streptomycins[5].

Jedenfalls zeigt sich, dass das Neomycin auch in Hinsicht auf die Nukleinsäure- und Nukleoproteidfällungen dem Streptomycin nahesteht. *Die hier untersuchten Tetracycline besitzen keine Fällungswirkung gegen Nukleinsäuren und Nukleoproteide. Pikromycin*[5], $C_{25}H_{43}O_7N$, hemmt die Keimung von Weizen und Gerste schon nach der Quellung in Lösung von 10 mg je 100 ml fast vollständig.

Was die *Chlorophylldefekte* betrifft, so unterscheiden sich die durch Tetracycline hervorgerufenen *wesentlich* von den durch Streptomycin und Dihydrostreptomycin erzeugten sowie von den bei Mutanten vom Albina-Typus auftretenden: Während nach der Streptomycinbehandlung neben normal grünen Keimblättern *nur rein weisse* (eventuell mit grünen Spitzen), nie aber mehr

[1] Starke Unterschiede zwischen verschiedenen Getreidearten sind schon bezüglich anderer chemischer Einflüsse, zum Beispiel von Carbamaten, gefunden worden. Siehe W. G. Templeman und W. A. Sexton, Nature *156*, 630 (1945). – Michell, Marth und Preston, jr., Science *120*, 263 (1954).

[2] Siehe Å. Gustafsson, Hereditas *28*, 483 (1942). – H. v. Euler, B. Bergman, H. Hellström und D. Burström, Hereditas *21*, 119 (1934). – G. Holm, Acta Agric. Scand. *4*, 466 (1954).

[1] Neomycin, entdeckt von S. A. Waksman und H. A. Lechevalier, Science *109*, 305 (1949).

[2] Kuehl *et al.* J. Amer. Chem. Soc. *71*, 2590 (1949).

[3] R. Giuliano, M. L. Stein und H. v. Euler, Ark. Kemi *6*, Nr. 53 (1954).

[4] L. Ziéglé, C. r. Acad. Sci. *231*, 310 (1950).

[5] H. Brockman und Mitarbeiter, Chem. Ber. *84*, 284 (1951); *87*, 856 (1954).

oder weniger hellgrüne Keimblätter auftreten, erscheinen nach der Quellung in Aureomycin- und in Achromycinlösungen (oder in einem Gemisch beider) je nach Menge des Tetracyclins und Dauer der Einwirkung *alle Grade* der Bleichung. Zum Teil beruht dieser Unterschied darauf, dass Streptomycin (wie auch Neomycin) weniger keimungshemmend ist als Aureomycin, so dass man letzteren Chlorophylldefekt nur in einem später eintretenden, aber weniger fortgeschrittenen Keimungsstadium beobachten kann. In diesem Zusammenhang mag noch erwähnt werden, dass Aureomycin *in vitro* die Succinodehydrogenase hemmt (blockiert).

Andere Arten von Chlorophyllhemmungen als die hier besprochenen sind früher von uns[1] erwähnt worden.

Über die Biochemie der Tetracycline, besonders des Aureomycins, findet man in der Literatur wertvolle Angaben. Die toxischen Wirkungen, welche Aureomycin im tierischen Stoffwechsel ausübt, konnten durch Versuche von Loomis sowie von Meter, Olesen und Williams[2] auf die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung zurückgeführt werden. Dieselbe wird durch einen Enzymkomplex in den Mitochondrien vermittelt. Von wesentlichem Interesse ist der Nachweis (Roine[3]), dass Aureomycin nach *peroraler* Eingabe einen erheblichen Einfluss auf die Bakterienflora des Darmes ausübt. Der Gehalt des Aureomycins im Serum nach oraler Eingabe wird durch Zitronensäure, Brenztraubensäure oder andere stark erhöht[4]. Zahlreichen Angaben zufolge ist Aureomycin ein spezifisches Mittel zur *Virus*-Bekämpfung. Diese und andere Ergebnisse haben uns veranlasst, den Einfluss des Aureomycins auf die frischen Tumorzellen des Yoshida-Ascites-Tumors zu untersuchen.

Von diesen an anderer Stelle demnächst mitzuteilenden Versuchen sei hier nur folgendes erwähnt:

0,3–0,5 ml Ascites unserer Yoshida-Ascites-Tumorratten wurden mit dem gleichen Volumen von Aureomycinlösungen verschiedener Konzentration (pH 7) 22 h bei 0° inkubiert und dann den Versuchsratten intraperitoneal eingespritzt. Wenn der verwendete Ascites 150000–200000 Tumorzellen je Kubikmillimeter enthielt, so waren zur Inkubation rund 4 mg Aureomycin erforderlich, um die Tumorentwicklung zu verhindern. Die tumorhemmende Wirkung des Achromycins war wesentlich schwächer, diejenige des Neomycins war nicht sicher nachweisbar.

H. v. Euler und M. L. Stein

*Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 10. November 1954.*

*Summary*

Euler (1947) and M. L. Stein (1953) had observed that germinating seeds of barley, rye, wheat and other grasses are colourless when exposed to solutions containing more than 0·2% of streptomycin or dihydrostreptomycin. These plants are not inhibited in growth. The chlorophyll already formed is not destroyed by streptomycin.

The present authors describe the bleaching effect on germinating seeds of chlortetracycline and tetracycline. These antibiotics inhibit or reduce the formation of chlorophyll in germinating seeds but the authors could not obtain this inhibition without toxic effects (reduced growth). Contrary to streptomycin, the tetracyclines are not able to precipitate nucleic acids and nucleoproteins.

[1] H. v. Euler, Z. physiol. Chem. *295*, 411 (1953). – Siehe auch C. L. Hamner und H. B. Tukey, Bot. Gazz. *112*, 525 (1952).

[2] J. C. Meter, J. J. Olesen und J. H. Williams, Science *113*, 273 (1951). – Proc. exp. Biol. Med. *81*, 215 (1952). – H. A. Lardy, J. Biol. Chem. *195*, 215 und 225 (1952).

[3] P. Roine und T. Ettala, Nature *169*, 1014 (1952).

[4] H. J. Eisner *et al.*, Pharm. exp. Therap. *108*, 442 (1951).

## On the Irreversible Agglutination of the Sperm of the Sea-Urchins Caused by the Sperm Extract

Antifertilizin, a substance neutralizing the sperm agglutinating effect of egg-water of the sea-urchin, was extracted from the sperm first by Frank[1]. Later Tyler and O'Melveny[2] described an acid soluble substance, which is extracted by acidulated sea-water. As to the action of antifertilizin in neutralizing fertilizin, agglutinating the eggs, dissolving the gelatinous coat of the egg, paralyzing the sperm and activating the unfertilized egg, this has been previously reported (Tyler; Wicklund[3]).

In the present experiment a new method of extraction of antifertilizin was used. The materials used were the sea-urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. About 10 $cm^3$ of sperm suspension in sea-water were fixed by adding 50 $cm^3$ of acetone. The solid fraction was collected on filter paper, and was then suspended in 20 $cm^3$ of distilled water by vigorous shaking. The suspension was acidulated by adding 5 $cm^3$ of N/10 HCl, and gently heated by boiling and after cooling filtered. The filtrate thus obtained was brought to pH 8 before use.

The sperm extract of both species of sea-urchins show a remarkable power to agglutinate the sperm of both species irreversibly. The sperm cells move actively in dilute solutions of the sperm extracts at the beginning and then form spherical masses. The mode of agglutination at the beginning is nearly the same as that caused by egg-water of the same species. Within 10 min the sperm cells form clots of irreversible agglutination. The sperm extracts of *Paracentrotus* and *Arbacia* cause the irreversible agglutination on the sperm of *Paracentrotus* up to 40 and 20 times dilution with sea-water respectively. The agglutination of the sperm of *Arbacia* is also observable in the presence of excess of $NaHCO_3$. After mixing equal volumes of sperm extract and M/2 $NaHCO_3$, the mixture is diluted with sea-water. The above mentioned extracts of *Paracentrotus* and of *Arbacia* show irreversible agglutination of the sperm of *Arbacia* up to 16 and 64 dilutions respectively. The agglutination is not observable in the control (mixture of bicarbonate and sea-water).

The eggs agglutinate instantaneously by sticking to each other forming a precipitation membrane on the surface of the jelly-coat, when they are put into the neutralized extracts. The sperm extract of *Paracentrotus* shows the ability of egg agglutination up to 40 and 160 dilutions to the eggs of *Paracentrotus* and of *Arbacia* respectively, and that of *Arbacia* is effective up to 20 and 80 dilutions to the eggs of those species respectively. The egg of *Arbacia* is therefore more sensitive to the extracts.

The extracts also show the capacity to neutralize the fertilizin, the sperm agglutinin of egg-water. The egg-

[1] J. A. Frank, Biol. Bull. *76*, 199 (1939).

[2] A. Tyler and K. O. Melveny, Biol. Bull. *81*, 364 (1941).

[3] A. Tyler, Physiol. Rev. *28*, 180 (1948). – E. Wicklund, Ark. Zool. [*A*] *40* ,Nr. 5 (1948).

water of more than 1000 units for the homologous sperm is completely inactivated by one tenth volume of the sperm extract of pH 8.

These facts show that the extracts are of the nature of the antifertilizin in the egg agglutination and in the neutralization of the fertilizin. Accordingly, the method of extracting sperm used in the present experiments gives a higher yield of antifertilizin than do the methods previously used. The writer believes that the irreversible agglutination of the sperm by the sperm extract is one of the characters of the antifertilizin.

Isao Motomura

*Stazione Zoologica, Napoli, and Biological Institute, Tohoku University, Sendai, Japan, October 20, 1954.*

*Zusammenfassung*

Eine neue Methode der Extrahierung von «Antifertilizin» aus den Samenzellen von Seeigeln, *Paracentrotus lividus* und *Arbacia lixula*, wurde beschrieben. Der Extrakt zeigte folgende Wirkungen: Neutralisierung des Fertilizins, nicht umkehrbare Agglutinierung der Samenfäden und der Eier bei beiden Seeigelarten.

## Observations on Vitamin $B_{12}$-Binding Factor from Hog Gastric Mucosa

In a previous paper[1] the results have been presented of the analysis by means of continuous paper electrophoresis of a vitamin $B_{12}$-binding preparation obtained from hog gastric mucosa by a modification of the method of Glass and coworkers[2].

The collected analytical figures of this preparation are: total nitrogen 7·8% (micro-Kjeldhal), uronic acids (as glicuronic acid)[3] 6·2%, hexosamines (as glucosamine hydrochloride)[4] 15·9%, reducing sugars (as glucose)[5] 16·3%, non glucosamine polysaccharides (as equimolar mixture of galactose and mannose)[6] 19·5%, binding power on vitamin $B_{12}$ (as vitamin $B_{12}$ bound by 1 mg of the preparation in presence of an equal concentration of free vitamin $B_{12}$, cup plate method with *E. coli* 113/3)[7] 0·904 $\mu$g/mg, titres as A and H group substances (greatest dilution completely inhibiting the agglutination of $A_1$ and O red blood cells respectively by human anti-A and eel anti-H sera in amounts of 3–4 completely agglutinating doses)[8] $1:1{\cdot}6 \times 10^6$ and $1:4 \times 10^5$.

Electrophoretic examination (Tiselius apparatus) (Fig. 1) showed the presence of five components with mobilities (ascending) of $-2{\cdot}0$, $-2{\cdot}7$, $-5{\cdot}5$, $-7{\cdot}4$, and $-8{\cdot}6 \times 10^{-5}$ cm$^2$ s$^{-1}$ V$^{-1}$.

The heterogeneity of the preparation suggested an attempt to analyze the different components by means of continuous paper electrophoresis (Durrum apparatus[9] soln. 2% w/v, phosphate, pH 6·4, I = 0·03, 580–600 V, 0·011–0·012 A, temp. 0–1°, *t* 48 h, Macherey, Nagel & Co., no. 214 paper, 35 × 35 cm sheets).

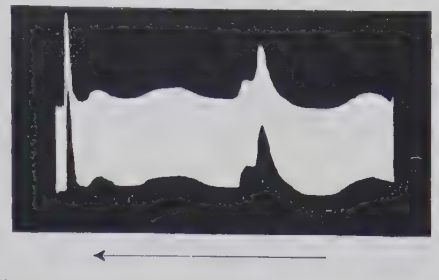


Fig. 1.–Electrophoresis pattern (ascending) after 120 min, of the original hog gastric mucosa vitamin $B_{12}$-binding preparation (1% [w/v] soln., at 6 V/cm, phosphate, pH 6, I = 0·2).

Colour reactions on the paper itself (bromophenol blue[1], toluidine blue[2] and Schiff[3]) and chemical, serological and microbiological assays on the different fractions collected, made it possible to distinguish only two groups of components.

One of these two groups had a low mobility, strongly absorbed u.v. light, positively reacted to Schiff, was stained by bromophenol blue and showed high values of non-glucosamine polysaccharides, hexosamines, reducing sugars, group substances A and H and binding power on vitamin $B_{12}$; the other group had a high mobility, showed fluorescence in u.v. light, metachromasia with toluidine blue and a high value of uronic acids.

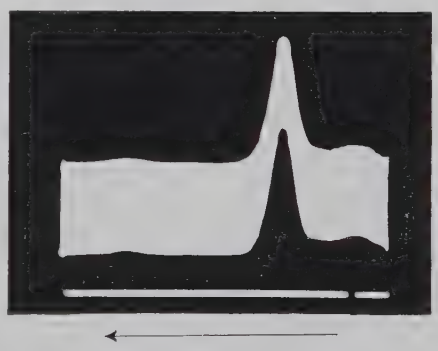


Fig. 2.–Electrophoresis pattern (ascending) after 120 min, of the almost pure hog gastric mucosa vitamin $B_{12}$-binding preparation (1% [w/v] soln., at 6 V/cm, phosphate, pH 6, I = 0·2).

As it was not possible to separate completely by continuous paper electrophoresis the components of the binding preparation under analysis, an attempt was made to purify the binding factor by the methods of extraction and fractional precipitation already used for the isolation of different blood group substances[4].

The original vitamin $B_{12}$-binding preparation was treated (5% w/v) with phenol-water solution (90% w/v) and the phenol insoluble residue discarded: to the phenol supernatant fluid, ethanol was fractionally added as a 1:1 phenol-ethanol mixture. The fractions precipitated at different ethanol levels were collected by

[1] A. Cresseri, Boll. Soc. It. Biol. Sper. *30*, 718 (1954).
[2] G. B. J. Glass, L. J. Boyd, M. A. Rubinstein, and C. S. Svigals, Science *115*, 101 (1952).
[3] Z. Dische, J. Biol. Chem. *167*, 189 (1947).
[4] L. A. Elson, W. T. J. Morgan, Biochem. J. *27*, 1824 (1933).
[5] E. J. King, *Microanalysis in medical biochemistry* (London, Churchill, 1947).
[6] M. M. Graff, E. M. Greenspan, I. R. Lehman, J. J. Holecheck, J. Lab. Clin. Med. *37*, 736 (1951).
[7] A. Cresseri, Atti dell'XI° Congr. Soc. It. Ematologia, Roma, *300* (1953).
[8] W. T. J. Morgan and H. K. King, Biochem. J. *37*, 640 (1943).
[9] E. L. Durrum, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 4875 (1951).

[1] H. G. Kunkel and A. Tiselius, J. Gen. Physiol. *35*, 89 (1951).
[2] K. G. Rienits, Biochem. J. *53*, 79 (1953).
[3] F. M. Antonini, F. Grandonico, and G. Piva, Lo Sperimentale *103*, 1 (1953).
[4] W. T. J. Morgan and H. K. King, Biochem. J. *37*, 640 (1943). – E. F. Annison and W. T. J. Morgan, Biochem. J. *52*, 247 (1952).

centrifugation, thrice triturated with ethanol to remove excess phenol and dried with ether. The highest binding power resulted in the fraction precipitated at 20–30% ethanol concentration (10·869 $\mu$g/mg). This fraction was redissolved in phenol-water solution and the ethanol fractional precipitation repeated: the activity resulted at the same ethanol levels, but only a slight increase in binding power was observed (11·961 $\mu$g/mg). This fraction was then dissolved in water (2% w/v), at 0°, Barium acetate (3% w/v) was added to assist flocculation, and the precipitates formed by fractional addition of ethanol collected by centrifugation, redissolved in water and treated with $Na_2SO_4$[1]: a precipitate was obtained, discarded by centrifugation, and the supernatant was dialysed 48 h against distilled water at 0–4° and dried in vacuo from the frozen state. The highest binding power resulted in the fraction precipitated at the 50–60% ethanol level. Electrophoretic examination shows that the material is not grossly inhomogeneous (only traces of a component with a slow and another with a high mobility seem to be present as impurities).

The collected physical and chemical data on this almost pure preparation of vitamin $B_{12}$-binding factor are: total nitrogen 8·2%, uronic acids nearly absent, hexosamines 17·1%, reducing sugars 18·3%, non-glucosamine polysaccharides 21·6%, binding power on vitamin $B_{12}$ 22·123 $\mu$g/mg. Electrophoretic mobility (ascending) (Fig. 2) is about $-2{\cdot}3 \times 10^{-5}$ $cm^2s^{-1}V^{-1}$.

With inhibition agglutination tests (anti-A and anti-H sera), only a very slight activity at the concentration of 1 mg/ml is present.

A. Cresseri

*Biological Laboratory, Istituto Carlo Erba per Ricerche Terapeutiche, Milano, October 1, 1954.*

*Riassunto*

Vengono riferiti i risultati dell'esame con elettroforesi continua su carta di una preparazione dalla mucosa gastrica di maiale dotata di potere di legame sulla vitamina $B_{12}$ e l'isolamento da essa con metodi di estrazione e di precipitazione frazionata del fattore responsabile di tale legame.

[1] H. Smith, R. C. Gallop and J. L. Stanley, Biochem. J. *52*, 15 (1952).

## Nuclear Uptake of Methionine-$S^{35}$ in the Newt Embryo

The incorporation of glycine-2-$C^{14}$ predominantly into the nuclei of the dorso-axial structures and induced neural plate of the amphibian embryo has been described in a previous paper, and interpreted as resulting from a higher nuclear metabolism of those regions of the embryo[1]. It should be of interest to experiment with another amino-acid, such as methionine, which might be expected to enter into rather more localized metabolic processes than glycine.

In a new experimental series, embryos of *Triturus alpestris* were kept at room temperature in solutions of DL-methionine-$S^{35}$, with original activities of 37·2 or 40·9 $\mu$c/ml. The incubations were all finished before the tracer had decayed for a month. The solutions also contained sodium sulphadiazine (May & Baker) to preserve asepsis. As the ratio of methionine to sulphadiazine was approximately 1·4:1, any antagonism between them, as

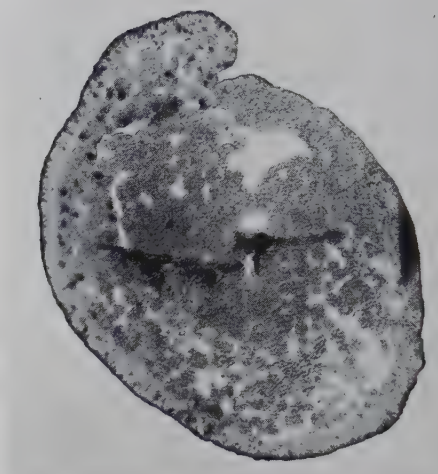


Fig. 1.–Autoradiograph of a mid-gastrula ( × 40).

described elsewhere[1], would probably have been very slight. Early blastulae or older embryos were slit open to facilitate the penetration of the tracer, and neural-fold stages onwards were transversally transected. After culture in the tracer solution, the embryos were rinsed three times in a similar solution made with non-radioactive methionine. The technique for preparation of the autoradiographs has been given before[2], but in the present experiments the exposure of the film was sometimes prolonged up to two months. When the last autoradiographs were developed the tracer had decayed for 3·5 months.

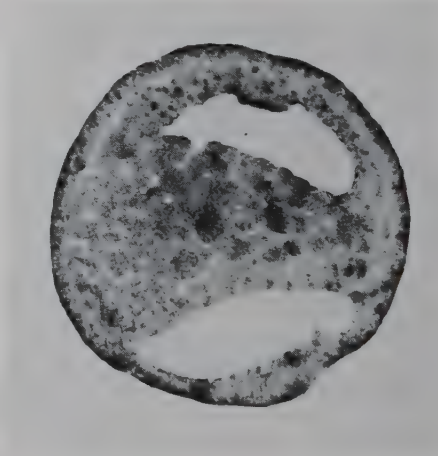


Fig. 2.–Autoradiograph of a neural-plate embryo ( × 40).

Embryos kept for 24 h in the tracer solution, from cleavage until the first appearance of the blastopore, show a marked nuclear activity in the animal half, which can be sometimes noticed particularly in the nuclei of the

[1] J. L. Sirlin and C. H. Waddington, Nature *174*, 309 (1954).

[1] J. S. Harris and H. I. Kohn, J. Pharm. exp. Therap. *73*, 383 (1941).

[2] J. L. Sirlin and C. H. Waddington, Nature *174*, 309 (1954).

dorsal lip of the blastopore; some cells in the floor of the blastocoele have also a considerable activity in their cytoplasm. In embryos incubated with tracer for 25 h,

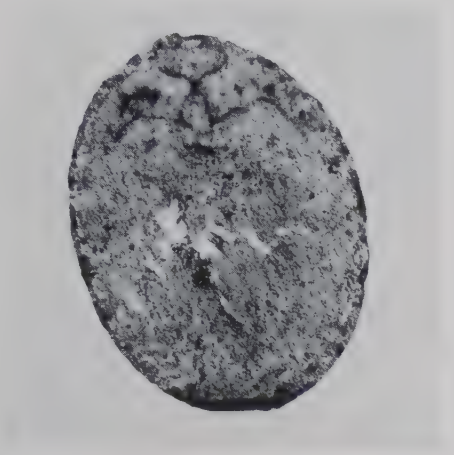


Fig. 3.–Autoradiograph of a neurula ( × 50).

from the late cleavage until mid-blastopore stages, there is a very high nuclear charge in the already invaginated mesoderm, and a lesser, although definite, nuclear charge in the presumptive mesoderm and neural plate; the activity in nuclei of other tissues is low (Fig. 1). Early blastulae incubated for 40 h until the neural-plate stage show high nuclear activity in the mesodermal roof of the archenteron, and also a less high, though clear, activity in the neural-plate nuclei. As a consequence of the long incubation, the cytoplasm has a considerable radioactive content, but it is still not nearly as dark as the nuclei (Fig. 2). Neural-fold embryos incubated for 28 h until

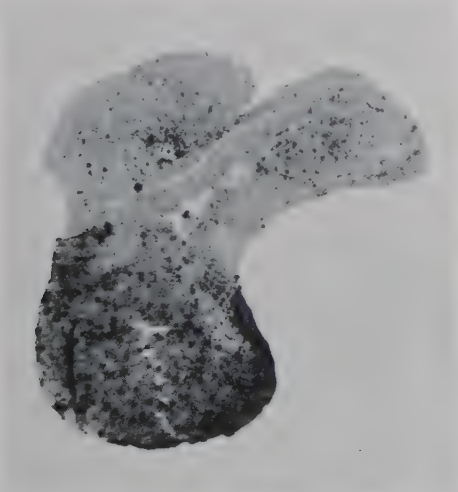


Fig. 4.–Autoradiograph of an exogastrula ( × 30).

the neural-tube stage show great activity in the interspaces between notochord, somites and neural tube. This may be partly because the flux of the tracer is easier along these spaces, but it must be pointed out that all soluble materials would have been removed during the preparation of the autoradiographs, and the high activity must indicate that the $S^{35}$ is incorporated into the material of the intercellular jelly. Some mesoderm and endoderm nuclei in these embryos also show great charge; although not clearly seen in the figure there appears to be an increased uptake in the mesoderm and epidermis, a fact which parallels the phenomena described for glycine-1-$C^{14}$ [1] (Fig. 3).

An *axolotl* exogastrula, kept in the tracer solution for 95 h since the blastula stage, demonstrates clearly that the ectodermal nuclei have a greater uptake than the endodermal nuclei; some active nuclei in the core of the evaginated endoderm are probably somitic (Fig. 4). This is evidence that the nuclear behaviour is tissue-specific, and is almost independent of the diffusion path of the tracer.

These experiments, together with those described earlier, suggest a common pattern in the utilization of DL-methionine-$S^{35}$ and glycine-2-$C^{14}$ by the nuclei in the dorso-axial structures, which are mainly responsible for the laying down of the embryonic organization. To what extent, in this process, the fate of the $S^{35}$ and $C^{14}$ atoms depends on their being part of the amino-acid molecule is at present under investigation.

The author wishes to thank Professor C. H. Waddington for encouragement during the course of the work. This investigation was carried out during the tenure of a British Council scholarship for which grateful acknowledgement is made. The work also received financial support from the Agricultural Research Council.

J. L. Sirlin

*Institute of Animal Genetics, Edinburgh, October 20, 1954.*

*Zusammenfassung*

In der vorliegenden Arbeit wird die Aufnahme von in DL-methionin enthaltenem $S^{35}$ durch die Zellkerne des Mesoderms und der Neuralplatte des Amphibien-Embryos beschrieben. Es wird auf die Ähnlichkeit hingewiesen, die mit der Aufnahme von in Glykokoll enthaltenem $C^{14}$ besteht.

[1] C. H. Waddington and J. L. Sirlin, J. Embryol. exp. Morph. (in press).

## Eine Spinne mit dem Körperbau von *Zilla-x-notata*, aber mit anderem Netzbauverhalten

Bei pharmakologischen Experimenten mit *Zilla-x-notata Cl.* in Bern in den Jahren 1949–1954 (Witt[1]) fiel es mir auf, dass die Radienzahl der Netze nicht mit der in anderen Arbeiten angegebenen übereinstimmte. So gibt König[2] für seine Zilla-litterata- = Zilla-x-notata-Netze eine mittlere Radienzahl von 25 mit Extremwerten von 21 und 31 bei 261 vermessenen Netzen an. Ich selber fand in Tübingen bei 48 während der gleichen Monate untersuchten Netze eine mittlere Radienzahl von 24,4 mit Extremwerten von 18 und 32, stimmte also bei den unter Laboratoriumsbedingungen in Tübingen gebauten Netzen mit den Zahlen von König aus Freiburg i.Br. überein. In 104 in Bern im Laufe von 4 Jahren wieder in den gleichen Sommermonaten vermessenen Netzen zählte ich durchschnittlich 42,5 Radien mit Extremwerten von 20 und 60, ein Unterschied gegenüber Tübingen, der mit dem T-Test von Student mit T = 4,7175 bei P 0,01 = 3,361 statistisch stark gesichert werden konnte Abbildung 1 zeigt ein Netz aus Bern.

[1] P. N. Witt, Helv. physiol. Acta *7*, C 65 (1949); Exper. *7*, 310 (1951); Behaviour *4*, 172 (1952).

[2] M. König, Z. Tierpsychol. *8*, 463 (1951).

Abb. 1. Zilla-Netz aus Bern vom 29. September 1954; 40 Radien. Das Netz wurde von dem Tier gebaut, dessen Epigyne in Abbildung 4 wiedergegeben ist.

Wiehle[1] schreibt über die Netze von *Zilla litterata* = *Zilla-x-notata Cl.*: «Bei der zur Behandlung stehenden Art schwankt die Speichenzahl stark, meine Notizen weisen Zahlen zwischen 14 und 34 auf, immerhin herrschen die von 25–30 vor.» Dagegen schreibt Wiehle[1] über das Netz von *Zilla atrica* (Koch), dass es sich deutlich vom Fanggewebe der *Z. litterata* durch die grössere Radienzahl unterscheide. «Diese ist besonders auffallend bei den Netzen der Tiere vor der vorletzten und letzten Häutung; ich zählte Mitte Juli in Wilsede bei 10 Fanggeweben 43, 43, 46, 51, 54, 41, 38, 45, 47, 50 Speichen.»

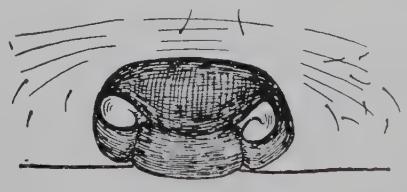


Abb. 2. Epigyne von *Zilla-x-notata Cl.* nach Wiehle[1].

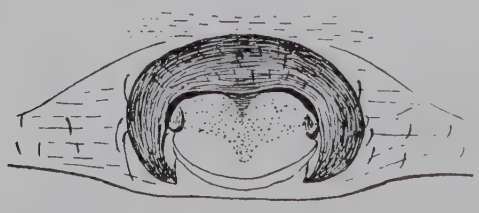


Abb. 3. Epigyne von *Zilla atrica* (Koch) nach Wiehle[1].

[1] H. Wiehle, in «Die Tierwelt Deutschlands» *23*, 30 (1931).

($\overline{X} = 45{,}8$.) Es erhebt sich also die Frage, ob wir nicht in Bern mit *Zilla atrica* gearbeitet haben?

Abb. 4. Durchgezeichnete Photographie der Epigyne einer Berner Zilla. (Die Aufnahme verdanke ich der Freundlichkeit der Herren Dr. Cottier und Dr. Garnier vom Pathologischen Institut der Universität Bern.) Der Pfeil zeigt auf die für *Zilla-x-notata* charakteristische kaudale Chitinspange.

Abbildung 2 und 3 geben die Epigynen von *Zilla-x-notata* und *Zilla atrica* nach Wiehle[1] wieder. Diese Abbildungen stimmen mit denen in Bösenberg[2] überein. Abbildung 4 zeigt eine durchgezeichnete Photographie der Epigyne, wie wir sie bei all den in unserem Laboratorium in Bern verwandten Zilla gefunden haben. Danach scheint kaum ein Zweifel möglich, dass wir mit einer den Körpermerkmalen nach als *Zilla-x-notata* anzusprechenden, dem Netzbau der *Zilla atrica* näherstehenden Art in Bern gearbeitet haben. Weitere Untersuchungen sollen zeigen, ob wir in Bern eine nur im Netzbau von der beschriebenen *Zilla-x-notata* abweichende Art vor uns haben und ob sich in anderen Teilen Europas noch andere Netzformen von *Zilla-x-notata* finden lassen.

Bei der Bestimmung der Spinnen verdanke ich Frau Prof. Dr. M. Meyer vom Zoologischen Institut der Universität Bern wertvolle Unterstützung.

P. N. Witt

*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern, den 25. Oktober 1954.*

*Summary*

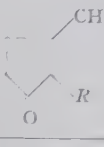
A spider living in and around Berne is described which shows the epigyne of *Zilla-x-notata Cl.* but whose web has a significantly higher number of radii in the manner of *Zilla atrica* (Koch).

[1] H. Wiehle, in «Die Tierwelt Deutschlands» *23*, 30 (1931).
[2] W. Bösenberg, in Zoologica *14*, Tafel III (1903).

## Cyclopentenones from Lactones

Frank and co-workers[1] have developed a procedure for the conversion of suitably constituted lactones to cyclopentenones. The procedure consists of a flash-distillation of the lactone over phosphorus pentoxide and has been employed by various workers[2]. A modification of the method, which involves a simple refluxing of the lactone with phosphorus pentoxide in a hydrocarbon solvent, has been preferred by some investigators[3]. However, both procedures result only in a moderate yield (20–50%) of the desired product.

[1] R. L. Frank, P. G. Arvan, J. W. Richter, and C. R. Vanneman, J. Amer. Chem. Soc. *66*, 4 (1944). – R. L. Frank, R. Armstrong, J. Kwiatek, and H. A. Price, J. Amer. Chem. Soc. *70*, 1379 (1948). – R. L. Frank and R. C. Pierle, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 724 (1951).
[2] F. B. La Forge and W. F. Barthel, J. Org. Chem. *10*, 222 (1945). – R. Sen-Gupta and P. C. Dutta, J. Indian Chem. Soc. *25*, 213 (1948). – S. M. Gupta and S. S. Deshapande, J. Indian Chem. Soc. *30*, 23 (1953).
[3] M. F. Ansell and D. H. Hey, J. Chem. Soc. *1950*, 2875. – D. W. Mathieson, J. Chem. Soc. *1951*, 177.

| No. | $R\cdot CH_2\cdot \overset{\displaystyle CH_3}{\overset{\vert}{C}}\cdot CH_2\cdot CH_2$ (O—CO) | Yield (%) of  | | Properties of ketones (PPA Method) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $R$ = | PPA Method | $P_2O_5$ Method (Rf.) | b. p. | $n_D^{29°}$ | m.p. (uncorr.) of 2,4-dinitrophenylhydrazone |
| 1 | $C_2H_5$ | 90–92 | — | 95–96°/18 mm | 1·4780 | 186 |
| 2 | n-$C_3H_7$ | 92–97 | 32 (Ib) | 105°/17 mm | 1·4775 | 182 |
| 3 | n-$C_4H_9$ | 92–95 | 30 (2a) | 124–125°/20 mm | 1·4775 | 153·5° |
| 4 | n-$C_5H_{11}$ | 92–95 | 50 (Ia) | 138–139°/20 mm | 1·4760 | 123 ° |
| 5 | n-$C_6H_{13}$ | 92–94 | (cf. 2c) | 145–147°/20 mm | 1·4735 | 135 |

The above methods involve a heterogeneous reaction mixture; it was thought that a homogeneous reaction medium may prove to be superior. This has actually been found to be so. When the lactone is heated with polyphosphoric acid (PPA) on the steam-bath (1½ to 2½ h) the yields of the cyclopentenones are excellent (Table).

A fuller account of this work will appear elsewhere. Further work on the scope of this method is being continued.

Our thanks are due to Prof. D. K. Banerjee for his interest in this investigation.

Ch. Rai and Sukh Dev

*Department of Organic Chemistry, Indian Institute of Science, Bangalore 3, October 18, 1953.*

*Zusammenfassung*

Es wird eine verbesserte Anordnung zur Überführung von Lactonen in Cyclopectonen beschrieben.

## PRO LABORATORIO

### Ein neuer Probenwechsler für automatische Radioaktivitätsmessungen

(Sample Changer)

Die vermehrte Anwendung der radioaktiven Isotopen in Naturwissenschaften und Medizin weckt immer mehr das Bedürfnis nach einer Apparatur, mit welcher die Aktivität einer grossen Anzahl von radioaktiven Präparaten automatisch gemessen werden kann. Die Einzelbestimmung von schwach aktiven Präparaten oder die Aufnahme von Zerfalls- und Absorptionskurven sind bekanntlich aus statistischen Gründen sehr zeitraubend, so dass sich die in den USA. erstmals entwickelten «sample changer» oder Probenwechsler gut bewährt und für Routinemessungen als unerlässlich erwiesen haben.

Solche Apparate bestehen im Prinzip aus einem gut abgeschirmten, glockenförmigen Geiger-Müller- oder Szintillationszählrohr, unter das die zu messenden Präparate automatisch geschoben werden können, und einer Vorrichtung, die bei jeder Probe die Zeitspanne registriert, während der die vorgewählte Anzahl Impulse abgegeben wird.

Im Auftrage des Röntgeninstituts der Universität Bern ist in der Werkstatt des Theodor-Kocher-Instituts ein neuer Probenwechsler konstruiert worden, der verschiedene Neuerungen aufweist.

Die Apparatur (Abb. 1) besteht aus der sogenannten Mimik (*1*), welche die Präparate unter den stark abgeschirmten Geigerzähler (*2*) schiebt, einem handelsüblichen Untersetzer (*3*) und einem Gerät (*4*), das die Messung steuert und die Resultate registriert. Die Apparatur fasst 31 Proben, die in den üblichen Metalltellerchen an der Peripherie einer runden Scheibe aufgelegt werden. Das Zählrohr ist mit fast 7 cm Pb abgeschirmt und kann in der Höhe verstellt werden, wobei der Abstand Eintrittsfenster–Präparat an einem Nonius abgelesen wird. Der minimale Abstand beträgt 1 mm, der maximale 40 mm. Zwischen Präparat und Zählrohr können automatisch bis zu 12 Absorber nacheinander eingeschoben werden. Die für die Zählung einer vorgewählten Anzahl von «counts» benötigte Zeit wird auf insgesamt 31 kleinen PTT-Telephonzählern (*5*) registriert. Die Konstruktion kann leicht so abgeändert werden, dass statt des glockenförmigen Geiger-Müller-Zählers ein Szintillationszählrohr oder ein sogenannter «window less flow counter» verwendet werden können. Als Untersetzer dient das Gerät von Landis & Gyr, Typ ELA 3, das leicht modifiziert wurde: es können aber leicht auch andere Untersetzer angepasst werden. Mit dem Apparat können 3 Arten von Messungen automatisch ausgeführt werden:

1. Die Aktivität von 31 Proben und 1–2 Blindwerten werden registriert. Die vorgewählte Impulszahl kann zwischen 8 und etwa $6\cdot10^6$ variiert werden. Die Zeitmessung erfolgt entweder bis 1000 s in Schritten von $^1/_{10}$ s oder bis 10000 s in Schritten von 1 s.
2. Ein und dasselbe Präparat wird in verschiedenen wählbaren Zeitabständen von 3 bis 60 min gemessen. Dies ist besonders wichtig für die Bestimmung der Zerfallskurven von radioaktiven Isotopen, wie sie zum Beispiel in einem Betatron oder Beta-Synchrotron durch eine energiereiche $\gamma$-Strahlung erzeugt werden können.
3. Eine neue wichtige Variante besteht darin, dass ein Präparat mehrere Male gemessen werden kann, und zwar mit automatischer, aufeinanderfolgender Zwischenschaltung von 12 Absorbern.

Das Funktionieren des Apparates kann am besten an Hand eines praktischen Beispiels erklärt werden. Die Präparate werden kreisförmig an der Peripherie einer Scheibe (siehe Abb. 1) angeordnet und ihre Anzahl an einem Präparatzähler (*6*) eingestellt. Die Messung wird durch Inbetriebsetzung eines Synchronmotors begonnen, welcher das erste Präparat in einer Gleitbahn unter das Zählrohr schiebt. Nach durchgeführter Bewegung werden erstens automatisch das Zählrohr mit dem Untersetzer, zweitens der Untersetzer mit dem Vorwahlzählwerk (*7*) (wo die gewünschte Anzahl von «counts» eingestellt ist) kurzgeschlossen und drittens die

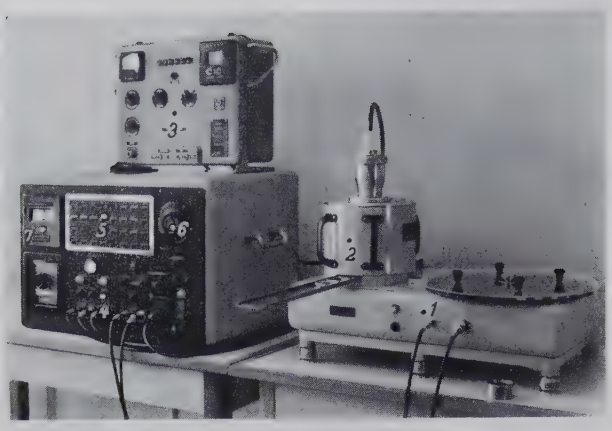


Abb. 1.

Zeitzählwerke mit einem Impulsgeber verbunden. Wenn die vorgewählte Anzahl «counts» erreicht ist, werden diese Verbindungen automatisch wieder abgetrennt. Das Präparat wird wieder auf die Scheibe zurückgeschoben, die durch die Drehbewegung das nächstfolgende vor die Gleitbahn stellt. Die Messung kann wieder beginnen.

Die Bedienung ist einfach: ausser dem Auflegen der Präparate sind lediglich einige Schalter und Tasten zu bedienen, um die Messung in Gang zu bringen. Die Präparatscheibe kann abgenommen und in einem andern Raum beschickt werden, um zu verhüten, dass das Gerät durch aktives Material verunreinigt wird. Während der Messung kann jederzeit die Zahl der noch zu messenden Präparate auf einer Skala abgelesen werden. Die Apparatur steht seit mehr als einem halben Jahr in Betrieb und hat sich sehr gut bewährt.

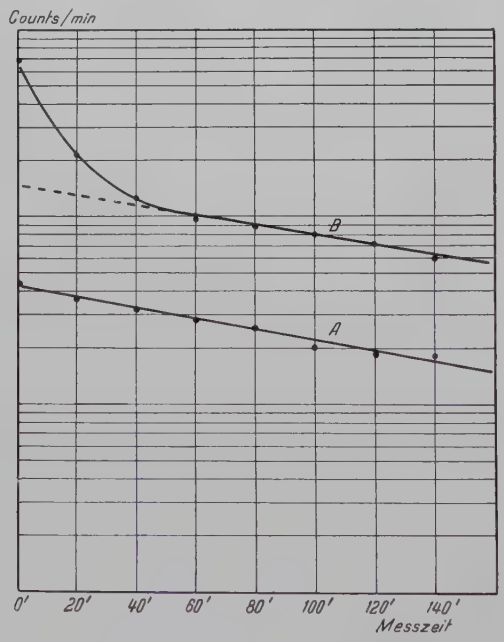



Abb. 2.

Ein Anwendungsbeispiel der 2. Betriebsart zeigt die Aufnahme der Zerfallskurven zweier Fluorsalze nach Betatronbestrahlung (31 MeV maximale $\gamma$-Energie) (Abb. 2). Die auf der Ordinate aufgetragenen «counts» je Minute wurden automatisch in Abständen von 20′ hintereinander registriert.

Aus der Bestrahlung von einem reinen LiF-Salz ist Kurve *A* entstanden, die sehr gut der Aktivitätsabnahme des durch den Prozess $^{19}F(\gamma, n)^{18}F$ erzeugten $^{18}F$ (Positronenstrahler–Halbwertzeit $T = 112'$) entspricht.

Kurve *B* zeigt die Resultante von 2 oder mehreren Zerfallskurven. Sie entspricht der Bestrahlung eines hygroskopischen und nicht sehr reinen $KF{\cdot}2H_2O$-Salzes, wobei die $^{15}O$-Aktivität ($T = 2{,}1$ min) wahrscheinlich am meisten vertreten ist.

Dieses und andere Beispiele zeigen die vielen, bequemen Anwendungsmöglichkeiten dieses Probenwechslers. Zum Beispiel die automatische Registrierung der Absorptionskurve einer für die Therapie bestimmten $^{32}P$-Quelle, wobei nachgewiesen werden kann, ob sie frei von anderen Isotopen ist (zum Beispiel $^{35}S$), oder die automatische Kontrolle eines Zählrohrs, womit dieselbe radioaktive Quelle bis zu 31mal gezählt werden kann.

Wir möchten der Firma Landis & Gyr in Zug für ihre Unterstützung danken. Sie hat uns die elektrischen Bauelemente zur Verfügung gestellt und das elektrische Schema ergänzt.

W. Bolliger und G. G. Poretti

*Theodor-Kocher-Institut der Universität und Röntgeninstitut der Universität und des Inselspitals, Bern, den 30. Oktober 1954.*

*Summary*

Description of an apparatus with which a great number (31) of radioactive samples can be measured automatically. The time required for collecting a preset number of counts is also automatically registered by 31 mechanical registers. Absorptions measurements until 12 various absorbers are possible, too.

---

## PRO EXPERIMENTIS

### A New Method for Intracerebral Injections

Polydipsia caused by intrahypothalamic injections of hypertonic NaCl-solutions in the goat was previously reported (Andersson[1]). For these injections an ordinary hypodermic needle was guided into the hypothalamus by help of two guiding rods and fixed on a holder previously screwed on to the skull in the same manner as that used by Hess[2] for placing electrodes in the brain. The injections were made using a 0·5 cm³ tuberculine syringe. As in this way only relatively large amounts of solution (0·1–0·2 cm³) could be injected and the "dead space" of the system was relatively big, the injection technique has been modified in the following manner.

An injection apparatus (Fig. 1) was constructed which made it possible to inject small known amounts of solutions with a minimum of disturbance to the animals. As in the earlier experiments, a metal holder (*1*) was fixed in the desired position on the skull by four screws. Holes for the injection needle were then drilled through the skull using a burr guide (*2*) temporarily fixed on the holder. The guide consisted of a piece of brass provided with holes of a diameter corresponding to the external diameter of the drill. The burr guide was then removed and replaced by a needle guide of similar shape (*3*) which was fixed on the holder by two screws (*4*). The holes of

[1] B. Andersson, Exper. *8*, 157 (1952); Acta Physiol. Scand. *28*, 188 (1953).

[2] W. R. Hess, *Das Zwischenhirn* (Benno Schwabe & Co., Basel, 1949).

the latter guide had a diameter corresponding to the outside diameter of the injection needle (0·35 or 0·45 mm). A roentgen photo of the skull was in each experiment taken before the operation started in order to facilitate the positioning of the holder and to determine what length of the injection needle was needed.

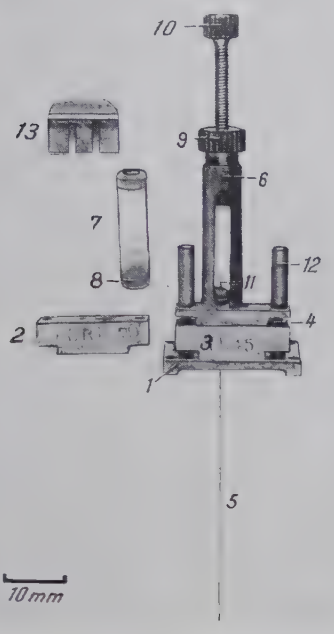



Fig. 1.–Apparatus for intracerebral injections of small amounts of fluid in unanaesthetised animals. (For further description see text.)

Fig. 2.–A roentgen photo of the skull of a goat with the tip of the injection needle placed in the posterior hypothalamus.

The injection apparatus proper consisted of a brass mantle (*6*) enclosing a removable glass ampulla (*7*). The ampulla contained the solution used for the injections and was closed at both ends with rubber (*8*). Two screws were attached at the top of the mantle—the larger one (*9*) fixed the ampulla in the mantle while the smaller screw was used to force the solutions in the ampulla through the injection needle. The upper sharp end of the needle extended into the mantle lumen and penetrated the lower rubber stopper of the ampulla (*11*). The injection apparatus was firmly fixed to the holder and the needle guide with two screws (*12*). Injections could be performed at different levels by placing pieces of brass of varying thickness (*13*) between the injection apparatus and the needle guide. For each complete turning of the screw (*10*) the calibrated apparatus was found to yield 0·003 $cm^3$ of the solution. Thus with this apparatus relatively small and exact amounts of fluid could easily be injected. Another advantage was that different solutions could be used merely by changing the ampulla.

The apparatus was especially well suited for experiments in goats with horns, as these animals could not damage the apparatus even when moving freely in a pen. Figure 2 shows a roentgen photo of the skull of a goat with horns where the injection needle was placed in the posterior hypothalamus. Experiments using this injection technique are in progress and will be published elsewhere.

B. Andersson and S. Larsson

*Department of Physiology, Kungl. Veterinärhögskolan, Stockholm, November 15, 1954.*

*Zusammenfassung*

Ein Apparat für Injektionen von kleineren Mengen ($< 0{\cdot}01$ $cm^3$) von Lösungen ins Gehirn wird beschrieben. Die Konstruktion erlaubt es, die Injektionen mit sehr wenig Störung der Tiere zu machen. Diese Technik wird für intrahypothalamische Injektionen an Ziegen angewandt.

# Informations - Informationen - Informazioni - Notes

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Essais d'élaboration des voies d'approche à la chimiothérapie du cancer. Action sur l'eau d'hydratation des tissus néoplasiques; action sur les protéines.

Par I. GRUNDLAND[1], Paris

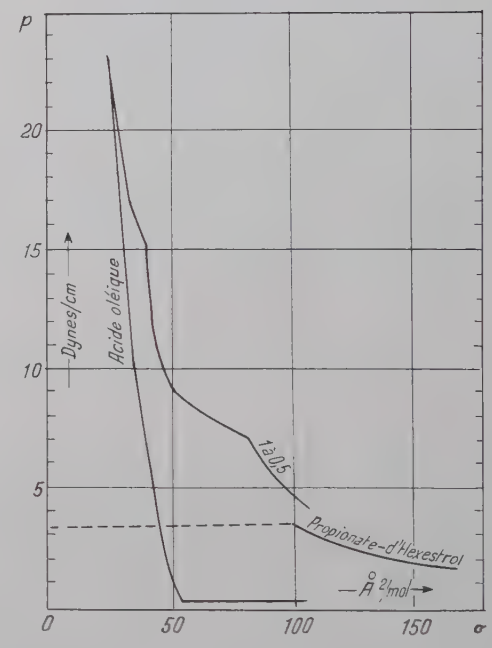
L'action chimiothérapeutique contre le cancer est rendue difficile du fait de l'ignorance dans laquelle nous nous trouvons en ce qui concerne la cause même de cette affection. Aussi la prétention de guérir le cancer est pour le moment dépourvue d'un point de départ certain. Cependant, ce défaut momentané des connaissances touchant l'origine du cancer ne doit nullement empêcher la prétention d'influer et peser sur le developpement de la tumeur. Ici nous entrons dans le domaine des notions parfaitement établies, et une incursion thérapeutique est susceptible d'être tentée avec succès.

La tumeur en se developpant nécessite la présence des éléments composants les tissus tels que: l'*eau*, les *sucres*, les *lipides*, les *protéines* et *nucléoprotéines*, les *oligo-élements* et *divers*. Une action thérapeutique peut peser sur ces ressources indispensables à la prolifération cellulaire et ralentir sa marche – cela peut constituer un premier pas vers la chimiothérapie du cancer.

Un effort dans ce sens concernant les *glucides* a été effectué récemment[2]. L'introduction de la d-glucosamine consommant l'A.T.P. (en vue de la formation de d-glucosamine-6-phosphate) ralentit la phosphorylation du glucose utilisable par la tumeur et l'on obtient ainsi une survie prolongée des souris traitées portant des sarcomes.

Un effort analogue concernant le *taux d'hydratation* des tissus tumoraux semble avoir été effectué et est susceptible d'être tenté. Ainsi c'est là un fait connu que l'augmentation du taux d'hydratation des tissus néoplasiques. On peut supposer que l'activité mitotique intense au niveau de la tumeur peut être en partie tributaire de plus d'aisance de la réactivité chimique se faisant dans une phase davantage aqueuse. Il serait par conséquent non sans importance d'égaliser le taux d'hydratation de l'ensemble des tissus afin d'éviter de favoriser les mitoses (ou les réactions chimiques en général) en un point distinct de l'organisme. Il semble qu'on puisse attribuer un tel effet dans l'organisme aux diverses substances œstrogènes lors de leur administration dans les affections cancéreuses. En effet, en ce qui concerne les hormones stéroliques il n'est pas sans intérêt de rappeler le travail de DAVIS, KRAHL et CLOWES[3] mettant en évidence, par l'étude en films monomoléculaires, l'existence des associations moléculaires (dues aux forces de VAN DER WAALS) entre stérols et hydrocarbures polycycliques. Ainsi les hydrocarbures (tels le benzopyrène ou méthylcholantrène) ne se dispersent pas sur le plan de l'eau par suite de l'absence de groupements polaires, d'où impossibilité d'évaluer leur surface moléculaire par la technique des films superficiels; par l'association stérol + hydrocarbure on obtient des surfaces moléculaires dépassant celle du stérol seul (40 Å²/mol.) la différence permettant d'apprécier la surface moléculaire des hydrocarbures.

D'après les résultats expérimentaux de ces auteurs on est autorisé de conclure que par suite de l'intervention d'une substance à structure stérolique, certains composés deviennent moins hydrophobes, et on peut alors supposer que cette action est certainement encore moins malaisée vis-à-vis des tissus déjà hydratés, mais peut être pas assez ou pas uniformément. Les tissus environnant ceux de la tumeur peuvent par suite de l'intervention de ces substances stéroliques devenir moins imperméables à l'eau d'hydratation des tissus cancéreux (s'y trouvant en excès) – il en résulterait une certaine homogénéisation du taux d'hydratation, ce qui pourrait influer sur la croissance d'un point distinct de l'organisme en l'occurence de la tumeur.




Isotherme $P = f(\sigma)$ des films monomoléculaires mixtes acide oléique – propionate d'hexestrol. Propionate d'hexestrol – élement variable. Lectures des points toutes les 3 min (5 min après l'étalement) dans le sens de la compression.

Nous avons montré[1] que ce raisonnement était valable pour les œstrogènes de synthèse dérivés des stilbènes. Ainsi, alors que le film monomoléculaire du propionate d'hexestrol peut-être suivi jusqu'à une pression de 3,5 dynes/cm et présente alors une surface de 100 Å²/mol au-delà de cette pression, le film gazeux se collabe, d'où impossibilité de continuer les mesures. Cependant, lorsqu'on projette sur le plan de l'eau un mélange contenant deux molécules d'acide oléique pour une molécule de propionate d'hexestrol – pour des raisons de commodité de dessein, la courbe tracée représente la somme d'un acide oléique + ½ propionate d'hexestrol – on obtient un film superficiel *résistant jusqu'à 7 dynes*, avec – lorsqu'on accentue la pression – rupture du complexe, expulsion vers la phase acqueuse du propionate d'hexestrol et subsistance sur le plan de l'eau de l'acide oléique seul.

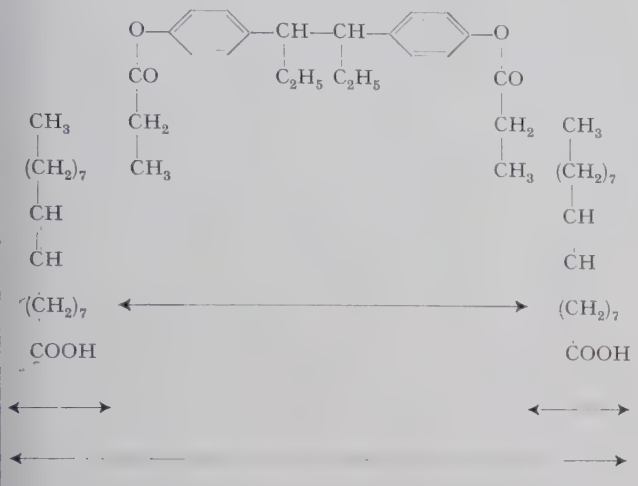
[1] Laboratoires du C.N.R.S., Faculté de Médecine, Paris.

[2] J. H. QUASTEL et A. CANTERO, Nature *171*, 252 (1953).

[3] W. W. DAVIS, M. E. KRAHL et G. H. A. CLOWES, J. Amer. Soc. *62*, 3080 (1940).

[1] J. GRUNDLAND, C. r. Soc. Biol. *142*, 941 (1948).

L'augmentation de la résistance du film à la compression allant de 3 dynes/cm jusqu'à 7 dynes/cm, prouve une association entre l'hormone œstrogène de synthèse et somme toutes une substance à caractère surtout paraffinique – et le même raisonnement que celui exposé ci-dessus est susceptible d'être développé.



Orientation probable du film mixte acide oléique (2 mol) + propionate d'hexestrol (1 mol) sur le plan de l'eau.

On pourrait classer également dans cette même catégorie des substances servant de trait d'union entre la phase aqueuse et paraffinique – la p-hydroxypropiophénone, les tri- ou hexaméthylolmélamine, et comprendre les motifs de leur activité anticancéreuse.

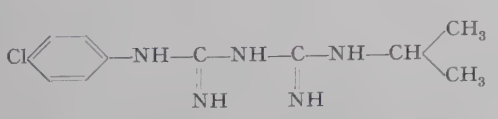
Nos recherches ont porté également sur la possibilité d'influencer la croissance tumorale par intervention dans le domaine des *protéines*, et à ce titre elles étaient destinées à toucher l'élément fondamental de la formation cellulaire.

L'hypothèse du point de départ serait la suivante: le protoplasme cellulaire enserre des gros agrégats protéiques provenant de la condensation (peptidisation) se faisant aux dépens de la fraction protéique libre humorale (à poids moléculaire moins élevé). Il faut croire qu'un remaniement protéique intense accompagne la prolifération cellulaire (et on connaît l'hyperpolypeptidémie des cancéreux) – il s'agit donc d'amener une condensation des éléments protéiques avant qu'elles n'atteignent la tumeur provoquant ainsi un retour à la normale du taux de la fraction protéique libre et également un ralentissement du turn-over de ces élements à travers la tumeur.

Pour atteindre cet objectif, diverses substances ont été examinées, et l'étude du rapport entre leur structure moléculaire et le problème posé a permis d'isoler deux groupements utiles (au stade actuel de cette recherche). Ainsi l'on a été conduit de proposer et d'effectuer la synthèse des composés résumant les caractéristiques utiles.

Voici les observations effectuées:

A.–Il a été constaté qu'en partie l'action de la Paludrine



peut s'expliquer par la réduction du choc protéique dû à la libération dans le sang des fragments protéiques des globules rouges éclatés (l'action sur le choc protéique présente une certaine analogie avec la tentative projetée de réduire la fraction protéique libre). En effet, lorsqu'on ajoute la Paludrine (60 mg dans 5 cm³ d'eau) au sérum sanguin (5 cm³) on observe un floculat (ph inchangé). Si l'on effectue une électrophorèse sur papier du surnageant, on constate un très sensible appauvrissement en protéines (par rapport au témoin), alors que le sédiment présente à l'électrophorèse sur papier une fraction protéique dénaturée qui ne migre pas et une autre qui migre, mais reste réduite – comparée au témoin.

Si l'on centrifuge le sérum sanguin après une pareille addition de Paludrine (durée de contact 15 min ou 24 h) – le culot de centrifugation séché soumis à la microanalyse révèle une teneur en:

Cl – 0,5% H – 8,85%

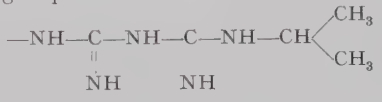
N – 9,33% { 1% N paludrine / 8,33% N protéique C – 58,57%

En admettant que tout le chlore appartienne à la Paludrine, on a (en comptant 5 N pour 1 Cl) 1% d'azote trouvé appartenant à la Paludrine, le restant 8,33% étant d'origine protéique. Il a été observé que toute la paludrine n'a pas précipité, mais celle précipitée a entraîné une fraction protéique – ce qui prouve la formation d'un complexe d'addition entre le biguanide et les protéines. Le chlorobenzène n'altère pas les protéines du sérum – la portion biguanide de la molécule paraît donc indispensable à cet effet.

Sur le sérum sanguin, après addition de la Paludrine, contact de 24 h et filtration, on a effectué une électrophorèse à l'appareil de Tiselius.

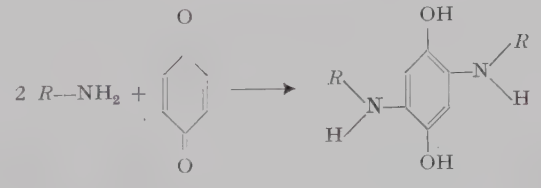
On observe une réduction moyenne de 12% ± 2% de la surface protéique totale, ce qui corrobore les résultats de la microanalyse du culot de centrifugation. L'albumine subit une réduction moyenne de 9% ± 2%, la $\gamma$-globuline reste sans changement, la $\beta$-globuline subit une réduction de la surface de 34% ± 2%, l'$\alpha$-globuline subit une réduction de la surface de 18% ± 2%.

En somme, la formation d'un complexe d'addition entre les protéines et probablement les groupements imines du noyau biguanide a été constatée; il en a été retenu l'utilité, dans la structure à proposer, de la présence d'un groupement:



On peut noter que des doses considérables de Paludrine ont été employées, cependant le complexe d'addition mis en évidence dénote une qualité propre à chaque molécule de la substance envisagée; la somme des effets de chaque molécule s'enregistre plus facilement par les moyens d'analyse mis en œuvre sans que l'on puisse pour autant nier le phénomène à l'échelle moléculaire (ou à plus faibles doses – aussi l'on ne désire pas du tout précipiter toutes les protéines, ce qui serait plutôt gênant).

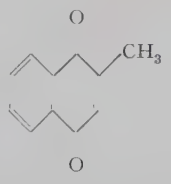
B. – La propriété des quinones de s'additionner aux protéines est connue. Elle peut être due, soit à la fixation des amines sur le noyau



soit à une liaison plus éphémère venant de la fonction quinone-hydroquinone (par pont hydrogène).

Nous avons mis en contact la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone (vitamine K connue comme intervenant dans la coagulation sanguine) avec le sérum sanguin (à saturation) pendant 24 h. Après filtration une électrophorèse à l'appareil de Tiselius est effectuée (après dialyse sur tampon au veronal). On note cette fois une réduction (par rapport au sérum témoin) de 5% ± 2% de la surface protéique totale. L'albumine subit une réduction moyenne de 7% ± 2%, la $\gamma$-globuline et l'$\alpha$-globuline restent sans changement, la $\beta$-globuline subit une réduction de la surface de 22% ± 2%.

La propriété de former des complexes d'addition avec les protéines a été ainsi prouvée pour la vitamine K (ce qui expliquerait son mode d'action influençant la coagulation sanguine) – et nous avons conclu à l'utilité de ce fragment dans une structure moléculaire à proposer à titre d'anticancéreux de synthèse.



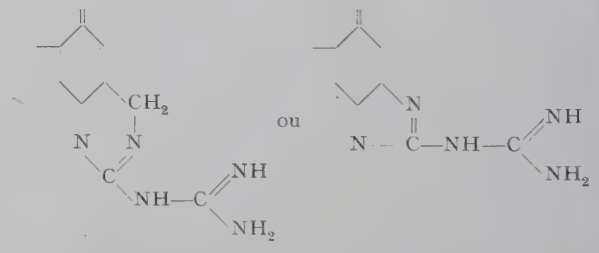
Ceci d'autant plus que par ailleurs nous avons constaté que les injections quotidiennes de la 2-méthyl-1,4-naphtoquinone pratiquées à des rats porteurs d'un épithélioma transplantable de Guérin permettent une survie appréciable aux animaux traités par rapport aux animaux témoins.

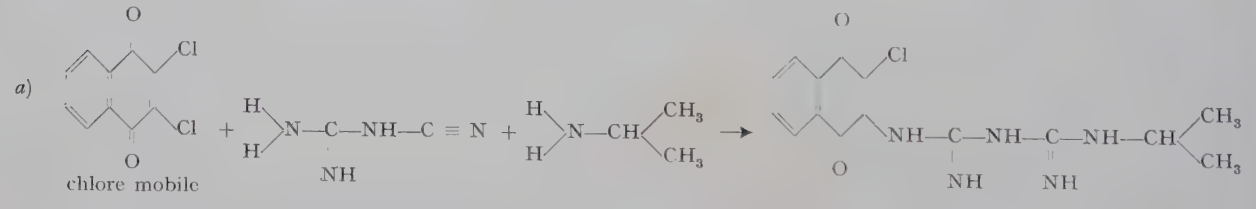
Ainsi nous avons été amenés à réaliser la synthèse des substances contenant les deux éléments dont l'utilité de chacun, prise à part, a été prouvée. La synthèse des substances suivantes a été tentée (formules a—c).

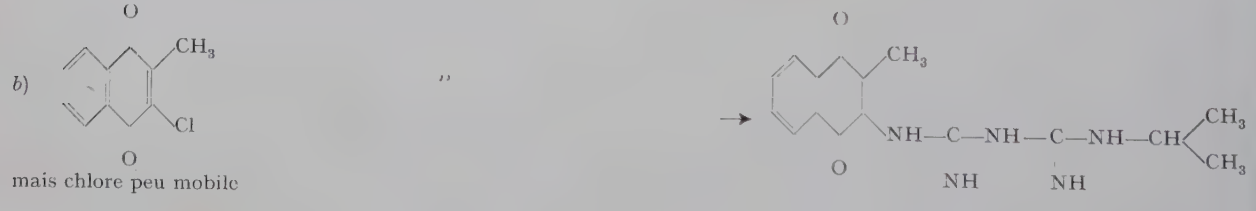
Une détermination électrophorétique au Tiselius a été pratiquée sur le sérum sanguin (5 cm³) additionné de $N_1$(3-$\gamma$'chloroéthyl-2-méthyl-1,4-naphtoquinone)-$N_5$-dimethyl-biguanide – structure incertaine, non confirmée par la microanalyse – à saturation (contact de 48 h dans le sac de cellophane durant la dialyse sur tampon au véronal à pH 8,6 et filtration précédant l'essai électrophorétique). Par action de ce composé, qui réalise dans sa structure moléculaire une fraction biguanide et une autre de naphtoquinone, l'affinité aux protéines desquelles a été objectivée précédemment, on observe une diminution de la teneur globale en protéines (du filtrat rapporté au sérum témoin), diminution portant sur la teneur de l'albumine et sur le taux de la globuline principalement. Ainsi on observe une réduction de la surface totale correspondant aux protéines présentes de 11,5%. L'albumine subit une réduction de 10%, l'$\alpha$-globuline et la $\gamma$-globuline restent sans changement, la $\beta$-globuline subit une réduction de la surface de 43%. (On remarquera que la $\beta$-globuline est souvent augmentée dans les états cancéreux – ainsi c'est le cas du myélome multiple, cancer du foie, etc.)

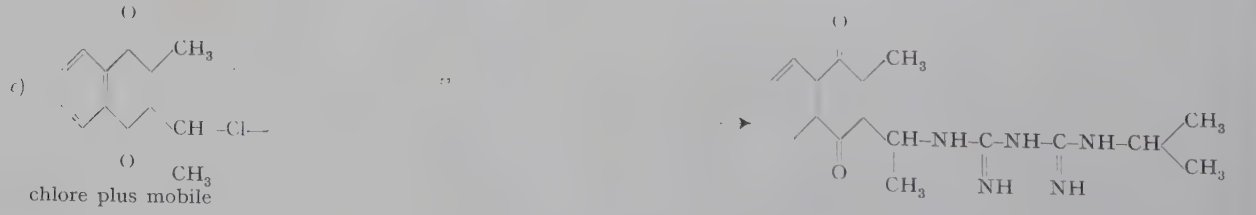
Ainsi l'essai électrophorétique à l'aide de l'appareil de Tiselius a permis de mettre en évidence le fait qu'au cours de la synthèse d'un composé réalisant la jonction des groupements fonctionnels utiles, on ne s'est pas écarté des propriétés souhaitées, et l'affinité aux protéines a subsisté. (Voir Tableau page 121).

Mais toutes ces substances paraissent avoir une faible solubilité, ce qui peut peser sur leur valeur thérapeutique éventuelle. Dans ces conditions, les synthèses peuvent être tentées en partant d'un noyau non pas de naphtoquinone mais de benzo-quinone, par exemple les structures $\alpha$, $\beta$, page 121, mais possibilité de cyclisation interne compliquant considérablement la synthèse; cyclisation entre fonction quinone et imine du type:





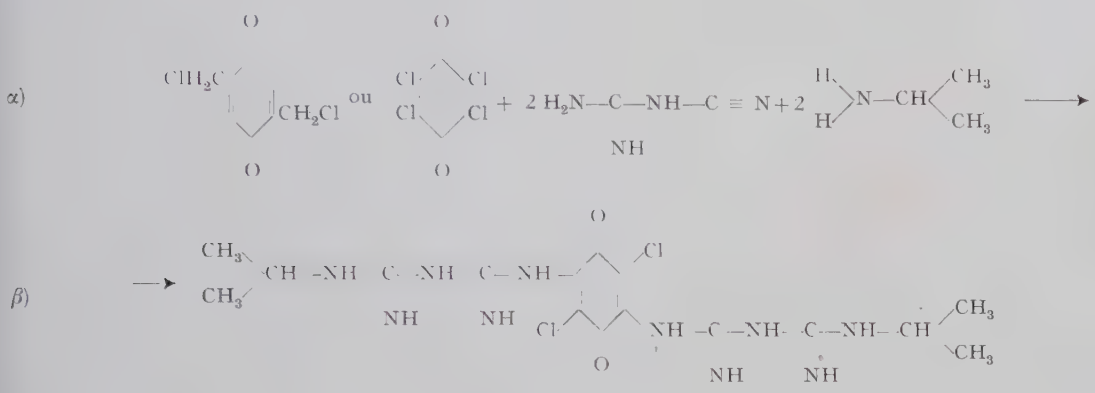



Ainsi, la recherche des anticancéreux de synthèse a été mise sur un canevas de chimie et de physique avec un objectif limité et réalisable (quoique parfois difficilement), celui de créer des substances déterminant dans l'organisme des conditions défavorables à une prolifération cellulaire.

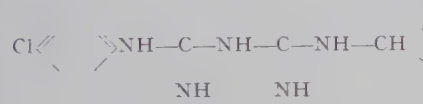
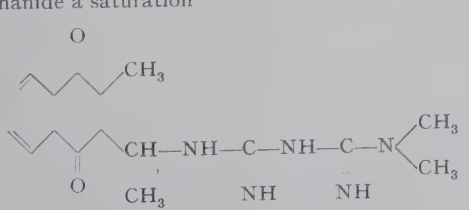
*Summary*

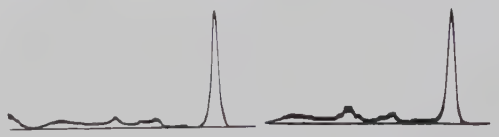
The recent successes in chemotherapy suggest that a solution of the same order should now be possible for cancer. The cause of cancer being still unknown, the therapeutic action aimed at is the creation in the organism of conditions unfavorable for cell multiplication. Certain of the factors essential for cell growth, such as the hydrocarbons, have already been studied in this light. The author has demonstrated the possibility of influencing the high degree of hydration of tumor tissue by the use of substances capable of effecting a homogeneous distribution of the dispersed substances in the aqueous phase. Furthermore, it was proposed to influence

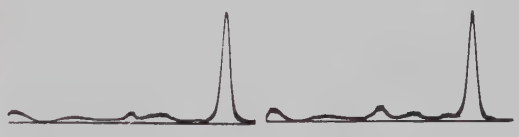


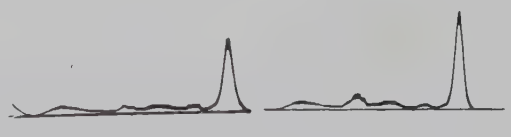
*Tableau*

Variations de la surface protéique par rapport au sérum témoin; déterminations électrophorétiques effectuées à l'aide de l'appareil de TISELIUS

| | Surface protéique totale | Surface des fractions protéiques | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Albumine | α-globuline | β-globuline | γ-globuline |
| Après addition à 5 cm³ de sérum sanguin de 60 mg de $N_1$-p-chlorophényl-$N_5$-isopropylbiguanide dans 5 cm³ d'eau  | −12% | − 9% | −18% | −34% | − |
| Après addition à 5 cm³ de sérum sanguin de 2-méthyl-1:4-naphtoquinone à saturation | − 5% | − 7% | − | −22% | − |
| Après addition à 5 cm³ de sérum sanguin de $N_1$(3 1′-chloréthyl-2-méthyl-1:4-naphtoquinone)-$N_5$-diméthyl-bignanïde à saturation  structure incertaine | −11,5% | −10% | − | −43% | − |



the protein repair accompanying cell multiplication by means of substances having an affinity for proteins. This was done to effect a condensation of protein elements before they reach the tumor, thus producing a return to the normal concentration of the free protein fraction, and, at the same time, a decrease in the turnover of these elements through the tumor. Electrophoretic measurements made with the Tiselius apparatus have made it possible to follow protein affinity and to suggest the synthesis of compounds containing quinone and imine groups which may prove valuable in future investigations along these lines.

—

## STUDIORUM PROGRESSUS

## Über die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas

*Mit besonderer Berücksichtigung der blutzuckergesteuerten Insulinsekretion*

Von H. Maske[1], München

Der Blutzucker wird im Wirbeltierorganismus konstant gehalten. Stärkere Abweichungen in der einen oder anderen Richtung bedingen Störungen der normalen Funktion. Einer der wichtigsten Faktoren zur Aufrechterhaltung der Blutzuckerkonstanz ist das Insulin. Das Wechselspiel zwischen Blutzuckerniveau und Sekretion des den Blutzucker senkenden Hormons ist seit langem Gegenstand der Diskussion. Im Laufe der Jahre wechselte die Ansicht über den Auslöser der Insulinsekretion mehrmals. Ein humoraler Mechanismus wurde von Staub[2] und Pollak[3] bereits 1921 bzw. 1923 vermutet. Den unmittelbaren Einfluss der Blutglukose auf die Insulinsekretion konnten Grafe und Meythaler[4] als erste experimentell beweisen. Gaye † [5], Foglia und Fernandez[6] zeigten am entnervten, homöotransplantierten Pankreas, dass dieser Einfluss ohne den Umweg über das Nervensystem ausgeübt wird. Zu derselben Zeit wiesen La Barre[7] und Mitarbeiter an Hand von komplizierten Tierversuchen eine unmittelbare Vaguswirkung auf die Insulinsekretion nach. Die inselspezifische Wirkung von Hypophysen-Vorderlappen-Injektionen (Young[8]) fand ihre Aufklärung durch Untersuchungen insbesondere von Lukens und Mitarbeitern[9] dahingehend, dass HVL den Blutzucker erhöht und auf diesem Weg eine Insulinsekretion bis zur Erschöpfung und Zerstörung der $\beta$-Zellen erzwingt. Der unmittelbare Einfluss der Blutglukose auf die Inseln wurde von einer Reihe weiterer Autoren mit den verschiedensten Methoden bestätigt. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang der direkte Nachweis des vermehrt abgegebenen Insulins im Blut durch Anderson, 1953. Ohne Zweifel besitzt der Organismus die Möglichkeit, die Insulinsekretion auch über das Nervensystem zu beeinflussen; der unmittelbaren Wechselbeziehung zwischen Blutzucker und Inseln scheint jedoch eine grössere Bedeutung zuzukommen. Die dabei in den Inselzellen ablaufenden Vorgänge sind bisher nicht diskutiert worden. Es besteht auch keine Möglichkeit, Vergleiche mit anderen endokrinen Drüsen anzustellen, da über intrazelluläre Stoffwechselprozesse bei der Inkretabgabe so gut wie nichts bekannt ist. Neuere, zum Teil eigene Arbeiten über das Verhalten des in den Inseln histochemisch nachweisbaren Zinks und über die Natur der Inselzellgranula erlauben es, die intrazellulären Vorgänge bei der blutzuckergesteuerten Insulinabgabe auf der Basis der bekannten chemischen Beziehungen zwischen Insulin und Zink zu diskutieren.

Als Beweise für die inkretorische Natur der Inseln lassen sich die folgenden Tatsachen anführen: die Insulingewinnung aus dem Pankreas, insbesondere aus den isolierten Inseln verschiedener Knochenfische, die Diabetesentstehung nach der selektiven Zerstörung der $\beta$-Zellen durch Alloxan und die Beseitigung des Hyperinsulinismus durch Entfernung von Inseladenomen. Zahlreiche anatomische bzw. histologische Untersuchungen haben sich mit den mikroskopisch darstellbaren Veränderungen der Inseln unter den verschiedensten Stoffwechselbedingungen befasst[1]. Es zeigte sich, dass die sogenannten $\beta$-Zellen und das Insulin in ihrem Verhalten enge Beziehungen zeigen. Die Zellgranula besitzen ähnliche chemische Eigenschaften wie Insulin; sie sind im Gegensatz zu den $\alpha$-Zellgranula in 70%igem Alkohol löslich und werden durch wässeriges Chromsublimat gefällt[2]. Mehrtägiges Hungern, kohlenhydratarme Kost und Insulininjektionen reduzieren sowohl die Zahl der $\beta$-Zellgranula als auch die Menge des aus der Drüse extrahierbaren Insulins[3]. An teilweise pankreatektomierten Tieren wurde gezeigt, dass die Inseln des Restpankreas zu einer Leistungssteigerung befähigt sind, die ein Mehrfaches beträgt. Dasselbe zeigt sich im Verlauf von längerdauernden Kohlenhydratbelastungen der Versuchstiere durch Glukoseinfusionen und nach Anwendung von Insulinantagonisten, zum Beispiel ACTH oder Wachstumshormon. Allerdings besitzt die Leistungsfähigkeit der Inseln eine Grenze, nach deren Überschreitung es durch Überanstrengung zur Erschöpfung und anschliessend zu reversiblen oder irreversiblen Schäden der Inselzellen mit Funktionsstörungen im Sinne eines Diabetes kommt. Bei verschiedenen experimentellen Diabetesformen und beim menschlichen Diabetes von

[1] II. Medizinische Universitätsklinik München.

[2] A. Staub, Biochem. Z. *118*, 93 (1921).

[3] H. Pollak, Ergebnisse inn. Med. *23*, 337 (1923).

[4] E. Grafe und F. Meythaler, Arch. exp. Path. Pharmak. *125*, 181 (1927); *131*, 80 (1928); *136*, 360 (1928).

[5] R. Gayet, *Le Fonctionnement endocrinien du Pancréas et sa régulation sans le concours du système nerveux* (Masson, Paris 1928).

[6] V. G. Foglia und J. Fernandez, C. r. séances Soc. biol. Buenos Aires *121*, 355 (1936).

[7] J. La Barre, Arch. internat. *29*, 227, 238, 257 (1927). – E. Zunz und J. La Barre, Arch. internat. Physiol. *29*, 265, 281 (1927); *31*, 162 (1929); C. r. Soc. Biol. *99*, 631 (1928).

[8] F. G. Young, Lancet *2*, 372 (1937); Biochem. J. *32*, 513 (1938).

[9] F. D. W. Lukens und F. C. Dohan, Science *92*, 222 (1940). – F. D. W. Lukens, F. C. Dohan und M. W. Wolcott, Endocrinology *32*, 475 (1943).

[1] Zusammenfassung der Literatur bei W. Bargmann, *Handbuch mikroskopischer Anatomie*, 6. Bd., 2. Teil (J. Springer, Berlin 1939), – H. Ferner, *Das Inselsystem des Pankreas* (Thieme-Verlag, Stuttgart 1952).

[2] C. H. Best, *On the Islets of Langerhans Experimental Diabetes*, A. Symposion (Blackwell, Oxford 1954).

[3] S. St. Barron und D. State, Arch. Pathol. *48*, 297 (1949). – C. H. Best, R. E. Haist und J. H. Rideout, J. Physiol. *97*, 107 (1939). – C. H. Best und R. E. Haist, J. Physiol. *100*, 142 (1941). – G. Gomori, N. B. Friedmann und D. W. Caldwell, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. *41*, 567 (1939). – S. T. Nerenberg, Amer. J. Clin. Path. *23*, 340 *23*, 999 (1953). – C. A. Woerner, Anat. Rec. *71*, 33 (1938); *75*, 91 (1939).

Jugendlichen fehlen dementsprechend ebenfalls die β-Zellgranula[1]. Das Resultat der histologischen Untersuchungen lässt sich dahingehend zusammenfassen, dass Produktion, Speicherung und Sekretion des Insulins in die β-Zellen der Inseln verlegt werden müssen und dass die Granula dieser Zellen das morphologische Äquivalent für den Insulingehalt der Inseln sind.

Über die Bedeutung der α-Zellen besteht bis heute wesentlich weniger Klarheit. Erst Untersuchungen aus den letzten Jahren lassen annehmen, dass dort ein dem Insulin entgegengesetzt wirkendes Hormon, das Glukagon, gebildet wird.

Insulin ist das erste in seiner Struktur weitgehend bekannte Protein. Das Grundmolekül mit einem Molekulargewicht von 11 464 besteht nach SANGER aus vier untereinander durch Disulfidbrücken über Zystin verbundenen Peptidketten, von denen jeweils zwei identisch sind[2]. Bekannt ist die Zahl und die Reihenfolge der Aminosäuren in den Peptiden. Diskutiert wird bisher noch die Lage der Peptide zueinander. In Abhängigkeit vom pH, von der Ionenstärke des Puffers, der Temperatur und der Konzentration wird eine unterschiedliche Molekülgrösse gefunden, die durch eine Aggregation von Grundmoleküleinheiten zu Polymeren zustande kommt[3]. Bemerkenswert ist, dass das Insulin von verschiedenen Tierarten nicht immer identisch zu sein scheint[4].

Unsere Kenntnisse über die Wirkung des Insulins sind bisher recht allgemeiner Art. Insulin setzt als einziges Hormon den Blutzuckerspiegel herab, indem es unter gleichzeitiger Bereitstellung von energiereichem Phosphat die Oxydation von Glukose in der Peripherie steigert[5]; ausserdem fördert es unter entsprechenden Bedingungen den Aufbau von Leberglykogen, Fett, Aminosäuren und Eiweiss aus Glukose. Über den Wirkungsmechanismus gaben im einzelnen bisher nur die Ergebnisse der Arbeiten aus dem Kreis um CORI Aufschluss, nach denen das im gesamten Organismus vorkommende Ferment Hexokinase durch Insulin aktiviert bzw. die Hemmung der Hexokinase durch Hypophysenvorderlappenextrakt aufgehoben wird. Hexokinase katalysiert die Bildung von Glukose-6-Phosphat aus Glukose und Adenosintriphosphat und macht den Zucker dadurch einem weiteren Abbau leichter zugänglich.

Nachdem die histologischen Untersuchungen gezeigt haben, dass sich die Insulinabgabe aus den Langerhansschen Inseln weitgehend dem Bedarf des Organismus anpasst, blieb es den Physiologen überlassen, den Vorgang der Bedarfssteuerung dieser inkretorischen Drüse weiter aufzuklären. Von den vielen Untersuchungen können hier nur einige angeführt werden. FOÁ und Mitarbeiter haben die aus dem Pankreas abfliessende Vene (V. pancreaticoduodenalis) eines Spenderhundes mit der V. femoralis eines Empfängerhundes anastomosiert und aus Blutzuckerveränderungen des letzteren Rückschlüsse auf eine Abgabe von blutzuckerregulierenden Hormonen aus dem Pankreas des ersteren gezogen. Im Anschluss an eine Blutzuckersteigerung beim Spenderhund kam es regelmässig zu einer Senkung beim Empfänger[1]. ANDERSON konnte zeigen, dass der Insulinspiegel im Blutplasma, der bei normalen, fastenden Hunden im Mittel 17 Mikro-E beträgt, nach Verabreichung von Glukose in Mengen, wie sie beim Glukosetoleranztest verwendet werden, auf durchschnittlich 39 Mikro-E je $cm^3$ ansteigt. Der Anstieg des Plasmainsulins ist nach Glukosebelastungen in gleicher Höhe zu beobachten, wenn das Mittelhirn oder das Rückenmark zwischen C 6 und D 3 durchschnitten wurde, obwohl die Glukosetoleranz durch diese Eingriffe herabgesetzt wird. Die Änderung der Glukosetoleranz wird also unter den angeführten Bedingungen nicht durch Störungen der Insulinsekretion hervorgerufen[2].

Eine Blutzuckersteigerung führt zu einer vermehrten Abgabe des blutzuckersenkenden Insulins aus den Inseln. Über den Weg, auf dem die vermehrte Blutglukose eine Insulinausschüttung bewirkt, bestand lange Zeit Unklarheit. Die Hypophyse und das vegetative Nervensystem wurden als notwendige Schaltstellen angenommen.

Schon sehr früh konnte jedoch gezeigt werden, dass das an eine andere Stelle des Organismus überpflanzte und vorher sorgfältig von allen Nerven freipräparierte Pankreas den Blutzucker konstant erhalten kann, während die Entfernung der Drüse einen Diabetes zur Folge hat. GRAFE und MEYTHALER haben den physiologischen Nachweis einer direkten Beziehung zwischen Blutzuckerspiegel und Insulinabgabe der Inseln führen können, indem sie nach Glukose-Infusionen in die den Inseln unmittelbar vorgeschaltete Arterie (A. pancreaticoduodenalis) eine durch die vermehrte Insulinausschüttung bedingte allgemeine Senkung des Blutzuckers fanden[3]. Die Tatsache, dass der erhöhte Blutzucker allein – ohne Zwischenschaltung anderer neurohormonaler Zwischenglieder – ausreicht, um eine Abgabe von Insulin aus den Inseln hervorzurufen, ist von anderen Forschern mit subtileren Untersuchungsanordnungen bestätigt worden. ANDERSON und LONG haben isolierte Bauchspeicheldrüsen von Ratten in einem eigens konstruierten Apparat durchströmt. Bei Glukosekonzentrationen von 141 bis 569 mg% beobachteten sie eine Insulinabgabe, bei niedrigeren Glukosekonzentrationen nicht[4].

Es sei darauf hingewiesen, dass SOSKIN die dargestellte Meinung über eine durch den Blutzucker regulierte Insulinabgabe nicht teilt[5]. Er schliesst aus Versuchen an pankreatektomierten Tieren, dass das Insulin unter physiologischen Bedingungen unbeeinflusst von der Höhe des Blutzuckers gleichmässig von den Inseln abgegeben und dass der Blutzuckerspiegel in erster Linie durch die Leber konstant gehalten wird. Da aber auf Grund der zahlreichen anderen Untersuchungen eine Variation der Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Blutzuckerhöhe mit Sicherheit angenommen werden muss, bleibt lediglich die Frage nach der Höhe der Blutzuckersteigerung offen, die zu einer zusätzlichen Insulinabgabe führt.

[1] E. T. BELL, Amer. J. Path. *22*, 631 (1946). – C. H. BEST, J. CAMPELL und R. E. HAIST, J. Physiol. *97*, 200 (1939). – C. H. BEST, J. CAMPBELL, R. E. HAIST und A. W. HAM, J. Physiol. *101*, 17 (1942). – M. G. GOLDNER und G. GOMORI, Endocrinology *33*, 297 (1943). – R. E. HAIST, Amer. J. Med., *Symposion on Diabetes mellitus* (1949). – J. H. HOMANS, J. Med. Research *33*, 1 (1915/16). – K. C. RICHARDSON, Proc. Roy. Soc. London *128*, 153 (1939).

[2] F. SANGER und H. TUPPY, Biochem. J. *49*, 463 (1951). – F. SANGER und E. O. P. THOMPSON, Biochem. J. *53*, 366 (1953).

[3] H. GUTFREUND, Biochem. J. *42*, 544 (1948); *50*, 564 (1952). – B. LOW, Nature *169*, 955 (1952). – R. F. STEINER, Arch. Biochem. Biophys. *39*, 333 (1952). – D. WRINCH, Science *116*, 562 (1952).

[4] J. LENS und A. EVERTZE, Biochem. Biophys. Acta *8*, 332 (1952).

[5] C. H. BEST, Ann. int. Med. *39*, 433 (1953).

[1] P. P. FOÁ, H. R. WEINSTEIN und J. A. SMITH, Amer. J. Physiol. *157*, 197 (1949). – P. P. FOÁ, L. SANTAMARIA, H. R. WEINSTEIN, S. BERGER und J. A. SMITH, Amer. J. Physiol. *171*, 32 (1952).

[2] E. ANDERSON, M. YENERMEN, R. W. BATES, A. LASKEY und D. MCK. RIOK, I. internat. neuroveget. Symposium, Florenz (1953).

[3] E. GRAFE und F. MEYTHALER, Arch. exp. Path. Pharmak. *125*, 181 (1927); *131*, 80 (1928); *136*, 360 (1928).

[4] E. ANDERSON und J. A. LONG, Endocrinology *40*, 92 (1947).

[5] S. SOSKIN, Proc. Amer. Diabetes Assoc. *6*, 349 (1946).

Weitere Faktoren, die den Kohlenhydratstoffwechsel unmittelbar ohne den Umweg über das Insulin beeinflussen – wie andere Hormone, Resorption, Verbrauch und Speicherung – sollen an dieser Stelle nicht diskutiert werden.

Wahrscheinlich besitzt der hochentwickelte Säugetierorganismus über die skizzierte direkte Steuerung hinaus weitere Möglichkeiten, Einfluss auf die Insulinabgabe zu nehmen. Für eine Beziehung des Nervensystems zur Regulation des Insulins (oder anderer in den Inseln produzierter Hormone) spricht das regelmässige Vorkommen von Vagusfaserendigungen in den Inseln. Die früher häufig postulierte direkte insulotrope Wirkung des Hypophysenvorderlappens ist bis heute noch nicht eindeutig nachgewiesen. Nach de Jongh besteht die Möglichkeit, dass das Wachstumshormon unter bestimmten Voraussetzungen insulotrop wirksam ist[1].

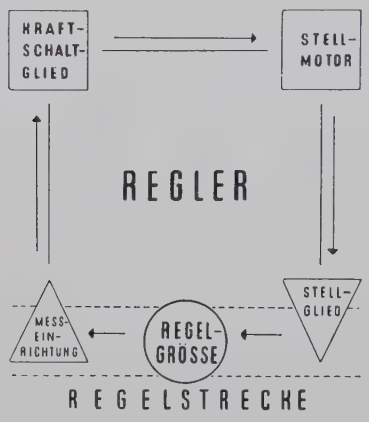



Abb. 1. Aufbau des technischen Regelkreises. Nach Drischel[2].

Die Konstanterhaltung biologisch wichtiger Grössen ist in letzter Zeit häufiger mit den Prinzipien technischer Regelvorgänge verglichen worden. Während die Regelung des Blutdruckes, der Körpertemperatur und des Blut-pH mehrfach in der Literatur besprochen worden ist, wurde auf die Beziehungen zwischen Blutzucker und Insulin in diesem Zusammenhang bisher kaum eingegangen. Und doch bestehen, wie aus dem Gesagten hervorgeht, sehr enge wechselseitige Beziehungen: Insulin ist das einzige Hormon, das den Blutzucker senkt. Die Ausschüttung des Hormons wird in erster Linie unmittelbar durch die Höhe des Blutzuckers beeinflusst. Dieser Vorgang entspricht dem Prinzip eines geschlossenen Regelkreises, in dem die «Regelgrösse» der Blutzucker ist – wobei die «Messeinrichtung», das «Kraftschaltglied» und der «Stellmotor» in den Inseln enthalten sein müssen –, während das «Stellglied» dem Insulin entspricht[2]. Unbekannt ist bisher, auf welchem Wege die Inselzellen die Blutzuckerhöhe registrieren und wie sie auf den als zu hoch registrierten Blutzucker mit einer Insulinabgabe antworten (Abb. 1).

Experimentelle Beobachtungen über das Verhalten von Insulin und histochemisch nachweisbarem Zink in den Langerhansschen Inseln haben enge Beziehungen in deren funktionellem Verhalten gezeigt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das bei physiologischem pH leicht lösliche Insulin mit Zink allein oder zusammen mit basischen Proteinen unlösliche Komplexe bildet, gewinnen diese Beobachtungen im Hinblick auf den geschilderten Regelvorgang vermehrtes Interesse. Im folgenden sollen die Zusammenhänge zwischen Insulin und Zink unter dem Gesichtswinkel der blutzuckergesteuerten Insulinabgabe diskutiert werden.

Okamoto beobachtete mit einer von ihm ausgearbeiteten histochemischen Methode, dass die Menge des histochemisch nachweisbaren Zinks von der Ernährung der Versuchstiere abhängt. Nach kohlenhydratreicher Fütterung fand er weniger Zink in den Inseln als bei kurzfristig hungernden oder bei mit Fett und Eiweiss ernährten Tieren[1]. Okamotos Beobachtungen wurden durch eine Reihe weiterer Untersuchungen ergänzt. Zink wurde bisher regelmässig u. a. in den Inseln von Mensch, Kaninchen, Hund, Pferd, Schwein, Maus, Ratte, Huhn, Taube, Frosch und bei verschiedenen Fischen histochemisch nachgewiesen. Das Metall kommt auch in allen anderen Organen vor. Die Möglichkeit der histochemischen Darstellung gibt jedoch Hinweise auf eine besonders hohe Konzentration und vielleicht auf die Art der vorliegenden Bindung.

In den Inseln enthalten allerdings nicht nur die Insulinproduzierenden $\beta$-Zellen Zink, sondern auch die $\alpha$-Zellen; bei der Ratte weisen die letzteren sogar wesentlich mehr auf als die ersteren. Auf Beziehungen zwischen Zink und $\alpha$-Zellen soll hier nicht näher eingegangen werden, da über die Zusammensetzung und die physiologische Bedeutung des blutzuckersteigernden Hormons aus den $\alpha$-Zellen, das Glukagon, bisher zu wenig Gesichertes bekannt ist.

Durch protrahierte Blutzuckersteigerungen mit Hilfe von wiederholten Glukosebelastungen oder Adrenalininjektionen wurde erreicht, dass histochemisch regelmässig kaum noch Zink in den Inseln nachzuweisen war[2].

Der Zinkgehalt der Inseln wurde weiter zur Erklärung der organspezifischen Wirkung diabeteserzeugender Verbindungen herangezogen. Durch Injektion verschiedener Substanzen, die mit Metallen und besonders mit Zink Komplexe bilden, konnten Inselzellschäden und bei einigen Tierarten auch ein Diabetes erzeugt werden, zum Beispiel mit Dithizon, Oxin u.a.[3].

Die geschädigten Inseln dithizon- und alloxandiabetischer Tiere haben die Fähigkeit zur physiologischen Zinkspeicherung weitgehend verloren. Nur gesundes Inselgewebe besitzt diese Eigenschaft in vollem Umfange[4].

Nach einer nativen Anfärbung des Gewebezinks durch intravenöse Dithizoninjektionen konnte die feinere Verteilung des Zinks innerhalb der Zellen an Gefrierschnitten studiert werden. Dieses liegt in den Inseln im Gegensatz zu verschiedenen anderen Organen in Granulaform vor. Die zinkhaltigen und mit Dithizon gefärbten Granula sind etwa so gross wie die mit anderen Färbe-

[1] S. E. de Jongh, *Insulin and growth Hormone; Experimental Diabetes*. A. Symposion (Blackwell, Oxford 1954).

[2] H. Drischel, *Bausteine einer dynamischen Theorie der vegetativen Regulation*. Wiss. Z. Univ. Greifswald, Mathem.-naturwiss. Reihe Nr. 2 (1952/53).

[1] K. Okamoto, Transact. Soc. path. jap. *32*, 99 (1942); *33*, 247 (1943).

[2] H. Maske, B. Stampfl und H. Gahn, Z. klin. Med. *152*, 68 (1953). – H. Maske, Z. Naturforsch. *8b*, 96 (1953). – H. Maske, H. Wolff und B. Stampfl, Klin. Wschr. *31*, 79 (1953).

[3] I. Kadota, J. Labor. Clin. Med. *35*, 568 (1950). – I. Kadota und T. Abe, J. Labor. Clin. Med. *43*, 375 (1954). – H. Wolff, H. Maske, B. Stampfl und F. Baumgarten, Arch. exper. Path. Pharmakol. *216*, 440 (1952).

[3] H. Maske, H. Wolff, B. Stampfl und F. Baumgarten, Arch. exper. Path. Pharmakol. *216*, 457 (1952). – H. Wolff, H. Maske, H. Stampfl und F. Baumgarten, Arch. exper. Path. Pharmakol. *216*, 440 (1952).

methoden darstellbaren und als morphologisches Insulinäquivalent aufgefassten Inselzellgranula (siehe oben). Unter extremen Stoffwechselbedingungen, zum Beispiel bei fastenden Tieren, nach Glukosebelastungen und beim Diabetes, verhalten sich die mit den verschiedenen Methoden darstellbaren Granula auch im Hinblick auf ihre Menge gleich[1] (Abb. 2).

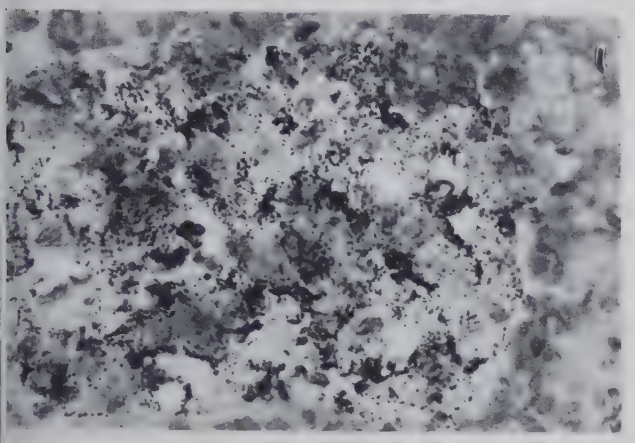


Abb. 2. Langerhanssche Insel. – Die schwarzgefärbten zinkhaltigen Granula sind deutlich zu erkennen (natürliche Farbe rot). Nativfärbung mit Dithizon, Nachfärbung des Gefrierschnittes mit Hämalaun. Vergrösserung etwa 480fach, Panphot-Leitz.

Weitzel fand in den weitgehend isoliert liegenden Inselorganen von Knochenfischen 100–600 $\gamma$ Zink/1 g Frischgewebe gegenüber 20–30 $\gamma$/1 g im exokrinen Pankreasanteil. Gleichzeitig durchgeführte Bestimmungen des Insulingehaltes ergaben ein Verhältnis von 2 bis 9 Teilen Zink auf 100 Teile Insulin[2]. Derartige Untersuchungen waren bei Säugetieren, die die Inseln im exkretorischen Gewebe verteilt enthalten, nicht durchführbar. Differenzen, die Scott und Fisher im Zinkgehalt von Bauchspeicheldrüsen stoffwechselgesunder und diabetischer Menschen gefunden zu haben glaubten[3], konnten infolgedessen durch Nachuntersucher auch nicht bestätigt werden[4, 5].

Zinkfütterung führt nach Untersuchungen derselben Forscher[6] und nach Drinker und Mitarbeitern bei Katzen zu einer Pankreasfibrose, zur Reduzierung des exkretorischen Gewebes und zu einer Anreicherung von Zink im Pankreas auf etwa das 7fache normaler Werte[7]. Radioaktives $Zn^{65}$ wurde von Sheline und Mitarbeitern[8], von Sherril und Wick[9] und von Odenthal und Mitarbeitern[1] an Mäuse, Hunde, Ratten und Kaninchen verabreicht. Dabei fand sich in den ersten Stunden nach der Applikation die höchste Konzentration im Pankreas, später jedoch wurde mehr Zink in Leber und Nieren gefunden[2]. Kohlenhydratstoffwechselstörungen in Form von Blutzuckererhöhung oder Zuckerausscheidung mit dem Harn wurden bei keinem Tier beobachtet. Lowry und Mitarbeiter untersuchten die Verteilung von $Zn^{65}$ vergleichsweise bei normalen und bei alloxandiabetischen Ratten. Sie fanden 24 h nach der Injektion von $Zn^{65}Cl_2$ im Pankreas diabetischer Tiere signifikant weniger $Zn^{65}$ als bei den Kontrollen[3]. Diese Beobachtung lässt darauf schliessen, dass das Zink in den Langerhansschen Inseln schneller umgesetzt und ausgetauscht wird als im exkretorischen Gewebe, wo die Konzentration des Metalls an und für sich wesentlich geringer ist.

Die engen Beziehungen, die demnach zwischen dem Zink und den nativen Insulindepots – bzw. der unmittelbaren Vorstufe des Insulins in den Inselzellgranulis – bestehen, erlauben es, Vergleiche mit dem Verhalten von Insulin und Zink *in vitro* anzustellen. Das Hormon kristallisiert nur in Gegenwart verschiedener Metalle, wie Zink, Kobalt, Nickel oder Kadmium[4]. Kristallisiertes Insulin enthält etwa 0,5% Zink und kann unter entsprechenden Bedingungen wesentlich mehr binden[5]. Höheres pH als 6,0 begünstigt und zinkbindende Bestandteile im wässerigen Medium reduzieren die zusätzliche Zinkbindung. Über die Art der Bindung wurden Untersuchungen von Eisenbrand und Mitarbeitern[6], Scott und Fisher[7], Weitzel und Mitarbeitern[8], Cohn und Mitarbeitern[9] durchgeführt. Der für die Kristallisation benötigten Mindestmenge von 0,5% entspricht 1 Atom Zink im Grundmolekül des Insulins mit dem Molekulargewicht von etwa 12000. Dieses Zink ist sehr fest in Form von Scherenkomplexen an Carboxyl- und Aminogruppen gebunden. Insulin kann bis zur Sättigung etwa 2,5% Zink aufnehmen. Über 0,5% hinaus gebundenes Zink kann durch Komplexbildner aus suspendierten Insulinkristallen entfernt werden. Ausführliche Versuche mit Serumalbumin haben gezeigt, dass Zink bei neutralem pH vorwiegend von den Imidazolgruppen der Eiweisse gebunden wird[10]. Diese Art der

[1] H. Maske, Z. Naturforsch. *8b*, 96 (1953).

[2] G. Weitzel, F. J. Strecker, U. Roester, A. M. Fretzdorff und E. Buddecke, Z. physiol. Chem. *295*, 83, 1953.

[3] D. A. Scott und A. M. Fisher, J. Clin. Investig. *17*, 725 (1938).

[4] J. Eisenbrand, M. Sienz, F. Wegel, Med. u. Chem. *4*, 259 (1942).

[5] Anmerkung bei der Korrektur: Es gelang uns in der Zwischenzeit, Inselzellgranula durch fraktionierte Zentrifugierung anzureichern. Insulin- und Zinkkonzentrationen verhielten sich in den verschiedenen Fraktionen parallel. Die höchsten Insulin- und Zinkkonzentrationen fanden sich in korpuskulären Bestandteilen von der Grössenordnung der Mitochondrien bzw. etwas kleiner. (Noch nicht veröffentlicht.)

[6] D. A. Scott und A. M. Fisher, Amer. J. Physiol. *121*, 253 (1938).

[7] K. R. Drinker, P. K. Thompson und M. Marsh, Amer. J. Physiol. *80*, 31 (1937).

[8] G. E. Sheline, J. L. Chaikoff, H. B. Jones und M. L. Montgomery, J. Biol. Chem. *149*, 139 (1943).

[9] J. W. Sherrill und A. N. Wick, J. Lab. a. Clin. Med. *41*, 40 (1953).

[1] F. Odenthal, W. Beiglböck, R. Clotten und W. Creutzfeldt, Klin. Wschr. *31*, 864 (1953).

[2] Eine Unterscheidung zwischen exkretorischem und inkretorischem Pankreasgewebe wurde bei diesen Versuchen nicht vorgenommen.

[3] J. R. Lowry, R. R. Baldwin und R. V. Harrington, Science *119*, 219 (1954).

[4] D. A. Scott, Biochem. J. *28*, 1592 (1934).

[5] E. J. Cohn, J. D. Ferry, J. Livingood und M. H. Blanchard, J. Amer. Chem. Soc. *63*, 17 (1941). – K. Hallas-Møller, K. Petersen und J. Schlichtkrüll, Science *116*, 394 (1952); Ugeskr. Laeger *113*, 1761 (1951). – D. A. Scott und A. M. Fisher, Biochem. J. *29*, 1048 (1935).

[6] J. Eisenbrand und M. Sienz, Z. physiol. Chem. *268*, 1 (1941). – J. Eisenbrand und F. Wegel, Z. physiol. Chem. *268*, 26 (1941).

[7] A. M. Fisher und D. A. Scott, J. Pharmacol. *58*, 93 (1936). – D. A. Scott und A. M. Fisher, J. Pharmacol. *58*, 78 (1936).

[8] G. Weitzel, Naturwissenschaften *40*, 285 (1953). – G. Weitzel, A. M. Fretzdorff, F. J. Strecker und U. Roester, Z. physiol. Chem. *293*, 190 (1953).

[9] E. J. Cohn, F. R. N. Gurd, D. M. Surgenor, B. Barnes, A. Brown, Derouaux, J Gillespie, F. Kahnt, W. Lever, C. Liu, D. Mittelmann, R. Mouton, K. Schmid und E. Uroma, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 465 (1950). – E. J. Cohn, D. M. Surgenor, K. Schmid, W. H. Batchelor und H. C. Isliker, Faraday Soc., London (1952).

[10] F. R. N. Gurd und D. S. Goodmann, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 670 (1952). – I. M. Klotz, I. L. Faller und J. M. Urquhart, J. Phys. Colloid. Chem. *54*, 18 (1950). – C. H. Tanford, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 211 (1952).

Bindung muss nach Cohn und Mitarbeitern auch für das weniger fest gebundene Insulinzink angenommen werden. Das Insulingrundmolekül enthält vier Moleküle Histidin. An dessen Imidazolresten gebundenes Zink kann sich zum Beispiel noch mit Glyzin verbinden, so dass gemischte ternäre Komplexe entstehen. Diese Ergebnisse erklären vielleicht die Befunde von Scott und Fisher, nach denen Zink eine wesentliche Rolle bei der Bindung von basischen Stoffen, zum Beispiel von Protamin an Insulin, spielt. Auch die Beobachtung von Weitzel über die Fähigkeit des Insulins, organische Zinkkomplexe – zum Beispiel Zink-Asparagin, Zink-Asparaginsäure und Zink-Arginin – aufzunehmen[1], ist vielleicht auf diese Art der Zinkbindung im Insulin zurückzuführen[2].

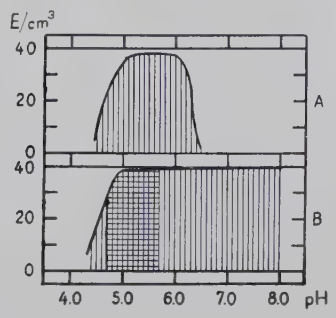



Abb. 3. Löslichkeit von Insulin bei verschiedenem pH nach Hallas-Møller[3]. Ordinate: gefälltes Insulin in E/cm³. Abszisse: pH. *A* Insulin in 0,01 m Na-Azetat. *B* Insulin in 0,01 m Na-Azetat mit 2 mg Zink (als Chlorid)/1000 E.

Während die ersten 0,5 % Zink weder die Wirksamkeit des Hormons noch dessen Löslichkeit ausserhalb des isoelektrischen Bereiches beeinflussen, verändert ein höherer Zinkgehalt die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Insulin ganz erheblich. Bei einem Überschuss von Zink im Lösungsmittel und beim Fehlen anderer Komplexbildner wird das Insulin als Zinkkomplex bei pH-Werten höher als 6,0 vollständig ausgefällt (Abb. 3). Diese Eigenschaft wurde von Hallas-Møller neuerdings zur Herstellung eines Depotinsulins ausgewertet. Der Zinkgehalt der insulinhaltigen Granula in den Inselzellen muss nach den vorher berichteten Eigenschaften von Insulin-Zink-Komplexen als Ursache oder Teilursache für deren schlechte Löslichkeit und für die Speicherung neu gebildeten Insulins in Granulaform angenommen werden. In welcher Form das physiologische Insulindepot vorliegt, ob bereits als wirksames Hormon oder in einer unwirksamen Vorstufe, ob als reiner Zinkkomplex oder mit dem Zink an basische zelleigene Eiweisse gebunden, lässt sich solange nicht entscheiden, bis die $\beta$-Zellgranula isoliert und analysiert worden sind. Lindner fand im Insulinrohextrakt regelmässig eine einheitliche niedermolekulare basische Eiweissfraktion. Insulin bildet mit diesem Protein eine im physiologischen pH-Bereich schlechtlösliche Verbindung, das sogenannte «Nativinsulin». Die Verzögerung der Wirkung, die nach der Injektion dieses Präparates beobachtet wurde, konnte durch Zusatz von Zink- oder Magnesiumionen weiter protrahiert werden[1].

Nach den eingangs angeführten Untersuchungen verlassen geringe Mengen Insulin in gleichmässigem Fluss die $\beta$-Zellen; bei vermehrtem Bedarf, zum Beispiel bei vermehrtem Glukoseangebot bzw. erhöhtem Blutzuckerspiegel, wird mehr Insulin abgegeben. Dieser zusätzlichen Ausschüttung muss eine Überführung des in Granulaform vorliegenden, zinkhaltigen Hormondepots in eine lösliche Form vorangehen. Die Möglichkeiten dazu sind beschränkt. Eine intrazelluläre pH-Änderung, die zur Lösung des Insulins führen könnte, müsste unphysiologisch niedrige Werte erreichen.

Eine zweite, eher im Bereich der Wahrscheinlichkeit liegende Möglichkeit besteht darin, dass den insulinhaltigen Granulis Zink durch stärkere Komplexbildner entzogen wird. Die Glukose selber als Auslöser dieses Vorganges bildet keine entsprechenden Zinkkomplexe, und doch muss die Glukose den Anstoss für die Bildung konkurrierender Komplexbildner geben. Eine Steigerung des Blutzuckerspiegels führt, wie Stier kürzlich zeigen konnte, zu einer ungewöhnlichen Intensivierung des Zellstoffwechsels in den Langerhansschen Inseln, die mit Hilfe von supravitalen Triphenyltetrazoliumchlorid-Injektionen nachgewiesen wurde. Bei normalen unvorbehandelten Tieren war in den Inseln eine noch geringere Formazanbildung zu finden als in dem auch nur wenig angefärbten umliegenden exkretorischen Gewebe. Nach vorhergehenden Glukosebelastungen der Versuchstiere zeigten die Inseln jedoch eine starke Formazanbildung, (Abb. 4). Die spezifische Empfindlichkeit der Inselzelle gegenüber dem Blutzucker als der Regelgrösse, die die

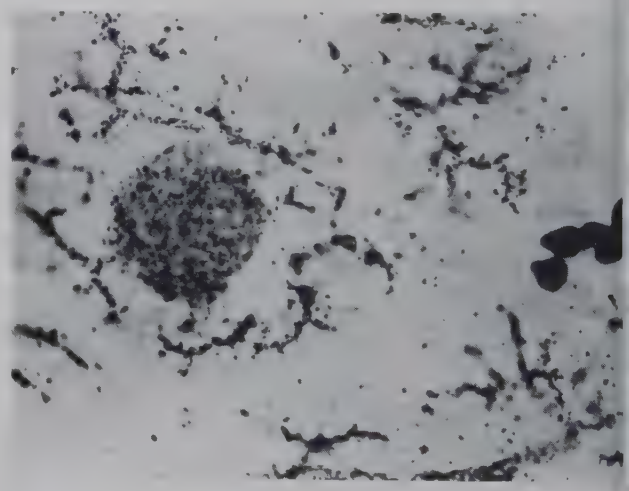


Abb. 4. Supravitale Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid. Pankreas nach Zuckerbelastung. Eine Insel mit starker Formazaneinlagerung. Nach Stier[2].

erste Voraussetzung für die Regelfunktion der Zelle ist, wurde mit der Stoffwechselsteigerung nachgewiesen. Die Glukose trifft in den Inseln auf das spezifisch ihren Stoffwechsel intensivierende Hormon, von dem entsprechend der Dissoziationsgleichung von Komplexen ein Teil gelöst ist:

[1] G. Weitzel, F. J. Strecker, U. Roester, Z. physiol. Chem. *292*, 286 (1953).

[2] In der Zwischenzeit haben Tanford und Epstein durch Wasserstoffionentitrationen an zinkfreiem und zinkhaltigem Insulin nachgewiesen, dass Zink bei physiologischem pH an die Imidazolreste des im Insulin enthaltenen Histidins gebunden ist. (C. Tanford und J. Epstein, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 2163, 2170 [1954]).

[3] K. Hallas-Møller, K. Petersen und J. Schlichtkrüll, Science *116*, 394 (1952).

[1] F. Lindner, Med. u. Chem. *4*, 248 (1942).

[2] A. Stier, Z. Anat. Entwicklungsgesch. *116*, 399 (1952).

$$\frac{(\text{Insulin}^{--})\,(\text{Zink}^{++})}{(\text{Insulin-Zink})} = k\,.$$

Es wäre nun festzustellen, ob Substanzen aus dem intermediären Zellstoffwechsel, besonders aber aus dem Glukosestoffwechsel, einen Einfluss auf die Insulinzink-Bildung besitzen. Nach eigenen Untersuchungen lässt sich schwerlösliches Zink-Insulin *in vitro* mit verschiedenen Aminosäuren, anorganischen und organischen Phosphaten und mit Gliedern des Zitronensäure-Zyklus in Lösung bringen[1].

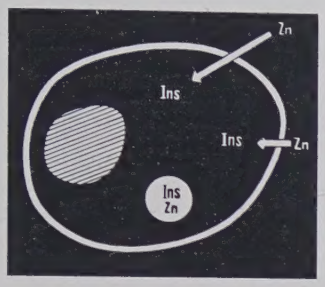



Abb. 5

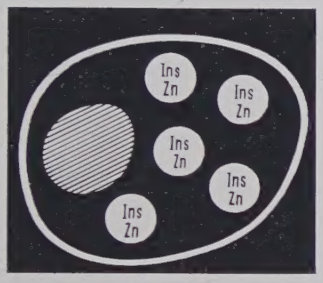



Abb. 6

Abb. 5 und 6. Schematische Darstellung: Aus neugebildetem Insulin und Zink entstehen schwerlösliche Komplexe in den $\beta$-Zellen der Langerhansschen Inseln.

Die verhältnismässig geringe Konzentration derartiger Stoffe in den Zellen ist nach NEUBERG[2] und BERSIN[3] kein Beweis gegen ihre physiologische Bedeutung in dieser Richtung, da infolge der ständigen biochemischen Neubildung der Substanzen auch bei kleinen Konzentrationen erhebliche Transportleistungen zustande kommen können. Grundsätzlich kann natürlich eine grosse Anzahl verschiedener komplexbildender Substanzen als Stellmotor des Regelkreises fungieren (siehe oben). Die Art dieser Substanz bzw. Substanzen ist durch den Eigenstoffwechsel der Inselzellen bestimmt. Wenn man von deren Eigenschaft, Insulin zu produzieren, und von ihrer besonderen Empfindlichkeit gegenüber einem vermehrten Glukoseangebot ausgeht, wird man in erster Linie an Bausteine des Insulins bzw. an Abbauprodukte der Glukose denken. Vorläufig bleibt hier jedoch eine Lücke in der Vorstellung über die Regelfunktion der Inselzellen.

Versuchen wir im folgenden, die Beziehungen zwischen Insulin und Zink in den Langerhansschen Inseln des Pankreas zusammenzufassen:

[1] H. MASKE, dtsch. Ges. physiol. Chem., Kiel, 1954.
[2] C. NEUBERG, Angew. Chem. *66*, 60 (1954).
[3] TH. BERSIN, Angew. Chem. *62*, 246 (1950).

Es ist eine besondere Eigenschaft der Inselzellen, Zink anzureichern. Eine Schädigung der Inseln – zum Beispiel durch diabeteserzeugende Substanzen – führt auch zur Beeinträchtigung der Zinkanreicherung. Als Erklärung für die Fähigkeit zur Zinkspeicherung ist womöglich die Tatsache der Insulinproduktion ausreichend. Neugebildetes Insulin bzw. dessen Vorstufe bindet in der Umgebung ausreichend zur Verfügung stehendes Zink und bildet schwerlösliche Komplexe entweder mit Zink allein oder gleichzeitig mit anderen Zellbestandteilen. Die Dissoziation des Komplexes unter

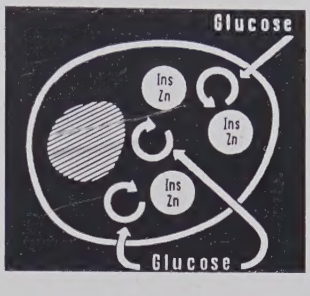



Abb. 7

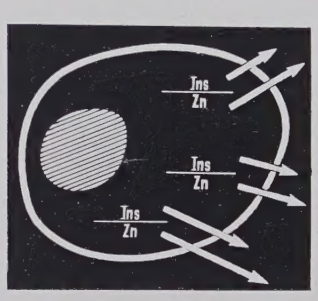



Abb. 8

Abb. 7 und 8. Schematische Darstellung: Vermehrt angebotene Glukose wird in den $\beta$-Zellen durch die primäre Anwesenheit von Insulin schnell umgesetzt. Substanzen aus dem intermediären Stoffwechsel bringen Insulin auf dem Weg über eine konkurrierende Komplexbindung in Lösung. Insulin und Zink werden an das Blut abgegeben.

den intrazellulären Bedingungen bestimmt das Ausmass der ständigen Insulinabgabe (Abb. 5 und 6).

Bei einem Anstieg der Blutglukose wird den $\beta$-Zellen vermehrt Glukose angeboten und durch die primäre Gegenwart von Insulin auch in stärkerem Ausmass umgesetzt als in anderen Geweben. Substanzen aus dem intermediären Stoffwechsel vermögen Insulin auf dem Weg über eine konkurrierende Komplexbildung mit dessen Zink in Lösung zu bringen. Das gelöste Insulin wird an das Blut abgegeben (Abb. 7 und 8).

Eine neurogen verursachte Insulinausschüttung könnte analog mit einer Intensivierung des Stoffwechsels der Inselzellen durch Endprodukte der Nervenreizung erklärt werden.

Die Höhe des Blutzuckers und die Dauer der Blutzuckersteigerung, die zu einer zusätzlichen Abgabe von Insulin aus den Langerhansschen Inseln über die basale Sekretion hinaus führen, sind bisher nicht bekannt. Durch diese Faktoren würde die «Reizschwelle» des reflektorisch anmutenden Geschehens charakterisiert. Nach eigenen Untersuchungen scheint die Dauer der Blutzuckersteigerung einen grösseren Einfluss auszuüben als die absolute Blutzuckerhöhe. Erst die Kenntnis

der normalen Reizschwelle würde Vergleiche mit den veränderten Verhältnissen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen erlauben. Beim Diabetes mellitus mit ständig erhöhtem Blutzucker ist sicher eine Änderung der Reizschwelle anzunehmen. Nach den klinischen Erfahrungen funktioniert der Regelvorgang hier zumindest wesentlich träger. Vielleicht ist die Fähigkeit der Inseln, bei vermehrtem Bedarf zusätzlich Insulin abzugeben, ganz erloschen, vorausgesetzt, dass überhaupt noch Insulin produziert wird. Einen Hinweis dafür, dass der Vorgang der blutzuckerinduzierten Insulinausschüttung bereits in der prädiabetischen Phase gestört ist, gibt die Feststellung von Katsch, dass hypoglykämische Zustände häufig vor dem Manifestwerden eines Diabetes beim Menschen vorkommen[1]. Derartige Hypoglykämien werden sonst nur bei einer pathologischen Vermehrung des Inselgewebes, zum Beispiel bei β-Zelladenomen und bei Pankreaskarzinomen, beobachtet. Da bei Hypoglykämien in der prädiabetischen Phase mehr Insulin abgegeben wird, als dem tatsächlichen Bedarf entspricht, muss man also die Ursache der Hypoglykämien in Störungen des Regelvorganges suchen. Alle Faktoren, die den «Regelkreis» an irgendeiner Stelle über längere Zeit stärker aus dem Gleichgewicht bringen, können wahrscheinlich auch zu einer Schädigung der insulinproduzierenden Zellen führen.

[1] G. Katsch, Deutsche Med. Wschr. *40*, 1331 (1950).

Die eigenen experimentellen Untersuchungen wurden mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

*Summary*

A collection is made of the findings of morphological and physiological investigations on the behaviour of the Langerhans islands of the pancreas, with regard to their regulating function. Histo-chemical investigations on the zinc content of the islands are especially described. On the basis of the chemical and physico-chemical relationships between insulin and zinc, an influence of this metal on the formation of intra-cellular insulin depots is presumed. Under the appropriate conditions, insulin, which is slightly soluble at physiological pH, forms an insoluble complex with zinc alone or together with basic proteins. Since insulin and zinc disappear from the islands after an increase of glucose, it follows that the glucose must be the indirect cause of a change in the insulin-zinc combination in the hormone depot. The metabolic processes which are involved in the insulin output induced by the blood sugar are discussed.

## Congressus

### SUISSE

*26–31 mai 1955 à Lausanne:* Congrès international de Pathologie comparée. Secrétaire général: Prof. P. Haudroy, Institut d'Hygiène, 19, rue César-Roux, Lausanne.

*21–27 juillet à Zürich:* Union internationale de Chimie pure et appliquée. Secrétaire général: Conseil de la Chimie suisse, Dr Morf, Sandoz S.A., Bâle.

*27–31 juillet à Zurich:* Symposium sur la Chimie macromoléculaire. Secrétaire général: Prof. Sadron, 3, rue de l'Université, Strasbourg (France).

### AUTRICHE

*12–18 juillet à Vienne:* Symposium de Micro-analyse organique. Secrétaire général: Prof. Zacherl, Institut de Chimie, Université Vienne.

### ITALIE

*12–16 juin à Pise:* Union internationale de Physique pure et appliquée. – Colloque sur les particules élémentaires. Secrétaire général: Prof. G. Polvani, Via Saldini 50, Milan.

### BELGIQUE

*28–30 juillet à Gand:* Colloque international sur les Problèmes biochimiques des Lipides. Secrétaire: Prof. R. Ruyssen, Laboratoire de Chimie médicale de l'Université, Sint-Jansvest, 12, Gand.

*1–6 août à Bruxelles:* Union internationale de Biochimie. Secrétaire général: Prof. C. Liébecq, 17, Place Delcour, Liège.

### U.S.A.

*June 6–13, New York:* 20th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology (Population Genetics). Director: Dr M. Demerc, The Biological Laboratory Cold Spring Harbor, New York.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

# Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Seit 1943 offizielles Publikationsorgan des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen

*Fasc. 3, 1954, enthält folgende Arbeiten:*

F. E. Lehmann, R. Weber, H. Aebi, J. Bäumler und H. Erlenmeyer: Versuche zur Kennzeichnung regenerationshemmender Lösungen von a-Aminoketonen. – F. Blum und R. Schmid: Über den Einfluss der Konzentration auf den Ablauf des experimentellen Alloxandiabetes. W. Wilbrandt: Geschwindigkeits- und Akzelerationstest der kolloid-osmotischen Hämolyse. E. Rothlin und B. Berde: Über die Wirkung hydrierter Mutterkornalkaloide auf isolierte Muskelstreifen des menschlichen Uterus nahe am Termin, am Termin und während der Geburt. A. Meyer und W. Wilbrandt: Zur Bestimmung der Aktivität der Cholinesterasen im menschlichen Blute. P. Lambossy et A. Müller: Vitesse des ondes dans les tubes. Influence de l'anisotropie de la paroi. W. Heimann und W. Wilbrandt: Untersuchungen über coronardilatierende Wirkungen am Langendorff-Präparat und ihre Deutung auf der Grundlage eines Verdrängungsantagonismus. O. Brenner-Holzach und J. Raaflaub: Die Korrelation zwischen der Schwellung isolierter Mitochondrien und dem Abbau der intramitochondrialen Adenosinnucleotide (ATP, ADP, AMP, CoA). K. Bucher und D. v. Capeller: Mechanismen der gegenseitigen Anpassung von Lungen und Körperkreislauf.

Preis des Jahresabonnements: Fr. 40.–, zuzüglich Porto.

Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute: Fr. 33.50, zuzüglich Porto.

Abonnemente nimmt Ihr Buchhändler entgegen oder der

VERLAG BENNO SCHWABE & CO., BASEL 10



# Unsere wissenschaftlichen Zeitschriften

**Archiv der Mathematik** – *Archives of Mathematics – Archives mathématiques*
Herausgegeben in Verbindung mit dem Mathematischen Forschungsinstitut in Oberwolfach von H. BILHARZ, H. KNESER, und W. SÜSS.
Erscheint seit 1948; ab Band 3 (1952) jährlich in 6 Heften von je ca. 80 Seiten Umfang. Abonnementspreis pro Band Fr. 60.—, Einzelheft Fr. 12.—.

**Zeitschrift für angewandte Mathematik und Physik** (ZAMP)
*Journal of Applied Mathematics and Physics – Journal de Mathématiques et de Physique appliquées*
Redaktionskommission: J. ACKERET, E. BAUMANN, P. SCHERRER, E. STIEFEL, F. STÜSSI, W. TRAUPEL, H. ZIEGLER.
Redaktion: R. SÄNGER, Eidg. Technische Hochschule, Zürich. Erscheint seit 1950 alle 2 Monate. 16 × 23 cm. Jährlich Fr. 38.—; Ausland sFr. 48.—; Einzelnummer Fr. 10.—.

**Elemente der Mathematik** – *Revue de mathématiques élémentaires – Rivista di matematica elementare*
Zeitschrift zur Pflege der Mathematik und zur Förderung des mathematisch-physikalischen Unterrichts. Patronat: G. DUMAS, Lausanne; H. HOPF, Zürich; H. JECKLIN, Zürich; B. L. v. d. WAERDEN, Zürich; Redaktion: L. LOCHER-ERNST – P. BUCHNER – E. TROST.
Erscheinen seit 1946 alle zwei Monate. Abonnementspreis: Jährlich Fr. 10.—, Ausland sFr. 14.—. Einzelnummer Fr. 2.50. Preis der grossenteils nachgedruckten Bände 1—6 (1946—1951) Fr. 24.— pro Band; Einzelheft Fr. 4.50.

**Helvetica Physica Acta**
Redaktionskomitee: P. HUBER, Basel – J. ROSSEL, Neuchâtel – A. MERCIER, Bern – A. PERRIER, Lausanne – P. SCHERRER, Zürich – J. WEIGLE, Genève. Redaktion: M. FIERZ, Universität Basel. Erscheinen seit 1928, jährlich 6—8 Hefte von zusammen etwa 7—800 Seiten. Abonnementspreis jährlich Fr. 44.—, Ausland sFr. 52.—, Einzelnummer Fr. 11.—. Preise der grossenteils nachgedruckten Bände 1—20 (1928—1947) zusammen Fr. 2400.—, Einzelbände Fr. 120.—, Einzelhefte Fr. 25.—.

**Experientia** – *Revue mensuelle des Sciences pures et appliquées – Monatsschrift für das gesamte Gebiet der Naturwissenschaft – Rivista mensile di Scienze pure e applicate – Monthly Journal of Pure and Applied Science.*
Editores: R. MATTHEY, Lausanne – A. v. MURALT, Bern – L. RUZICKA, Zürich – P. HUBER, Basel. Redaktor: H. MISLIN, Basel/Mainz. 21 × 30 cm. Erscheint seit 1945. Abonnementspreis Fr. 36.—, Ausland sFr. 46.—, Einzelnummer Fr. 4.—.

**Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie** – *Revue suisse d'Hydrologie. – Hydrographie, Hydrobiologie, Fischereiwissenschaft, Abwasserreinigung – Hydrographie, hydrobiologie, aquiculture, épuration des eaux polluées.*
Herausgegeben von der Hydrobiologischen Kommission der Schweiz. Naturforschenden Gesellschaft. Redaktion: O. JAAG, ETH., Zürich. Erscheint seit 1920. 24,5 × 17 cm. Jährlich 2 Hefte. Abonnementspreis Fr. 24.—, Ausland Sfr. 28.—, Einzelheft Fr. 14.—.

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL/STUTTGART